

ÜBER DIE ROLLE DES BASISCHEN
MYELINSCHIEDENPROTEINS
BEI DER MULTIPLER SKLEROSE

Michael Zitzelsberger

Diss. München
1984



Aus dem Institut für Chirurgische Forschung
der Universität München
- Klinikum Großhadern -
Vorstand: Prof. Dr. Dr. h.c. W. Brendel

ÜBER DIE ROLLE DES BASISCHEN MYELINSCHIEDENPROTEINS
BEI DER MULTIPLEN SKLEROSE
- eine klinisch-experimentelle Arbeit -

Inauguraldissertation
zur Erlangung der Doktorwürde in der gesamten Medizin
an der Ludwig-Maximilians-Universität zu München

vorgelegt von
Michael Zitzelsberger
München
1982

Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät
der Universität München

Berichterstatter: PD. Dr. B.U. v. Specht

Mitberichterstatter: Prof. Dr.med. W. Brendel

Dekan: Prof. Dr.med. W. Spann

Tag der mündlichen Prüfung: 10.4.84

INHALTSVERZEICHNIS

I. Vorwort	
II. Inhalt	
III. Liste der wesentlichen Abkürzungen	
IV. Haupttextlicher Teil	
1. Einleitung	
2. Historische Darstellung des	
Tuberkulose	
3. Tuberkulose-Erkrankungen im	1 - 12
Tuberkulose und die Tuberkulose	
Tub.	
4. Tuberkulose der Lunge	13 - 22
5. Tuberkulose der Niere	23 - 24
6. Tuberkulose der Harnblase	25 - 26
7. Tuberkulose der Prostata	27 - 28
8. Tuberkulose der Samenblase	29 - 30
9. Tuberkulose der Uterus	31 - 32
10. Tuberkulose der Vagina	33 - 34
11. Tuberkulose der Vulva	35 - 36
12. Tuberkulose der Perinealdrüse	37 - 38
13. Tuberkulose der Schilddrüse	39 - 40
14. Tuberkulose der Brustdrüse	41 - 42
15. Tuberkulose der Lymphknoten	43 - 44
16. Tuberkulose der Knochen	45 - 46
17. Tuberkulose der Gelenke	47 - 48
18. Tuberkulose der Haut	49 - 50
19. Tuberkulose der Augen	51 - 52
20. Tuberkulose der Ohren	53 - 54
21. Tuberkulose der Nase	55 - 56
22. Tuberkulose der Mundhöhle	57 - 58
23. Tuberkulose der Rachen- und Kehlkopf	59 - 60
24. Tuberkulose der Luftröhre	61 - 62
25. Tuberkulose der Bronchien	63 - 64
26. Tuberkulose der Lungen	65 - 66
27. Tuberkulose der Pleura	67 - 68
28. Tuberkulose der Peritoneum	69 - 70
29. Tuberkulose der Pericardium	71 - 72
30. Tuberkulose der Harnblase	73 - 74
31. Tuberkulose der Harnröhre	75 - 76
32. Tuberkulose der Prostata	77 - 78
33. Tuberkulose der Samenblase	79 - 80
34. Tuberkulose der Uterus	81 - 82
35. Tuberkulose der Vagina	83 - 84
36. Tuberkulose der Vulva	85 - 86
37. Tuberkulose der Perinealdrüse	87 - 88
38. Tuberkulose der Schilddrüse	89 - 90
39. Tuberkulose der Brustdrüse	91 - 92
40. Tuberkulose der Lymphknoten	93 - 94
41. Tuberkulose der Knochen	95 - 96
42. Tuberkulose der Gelenke	97 - 98
43. Tuberkulose der Haut	99 - 100
44. Tuberkulose der Augen	101 - 102
45. Tuberkulose der Ohren	103 - 104
46. Tuberkulose der Nase	105 - 106
47. Tuberkulose der Mundhöhle	107 - 108
48. Tuberkulose der Rachen- und Kehlkopf	109 - 110
49. Tuberkulose der Luftröhre	111 - 112
50. Tuberkulose der Bronchien	113 - 114
51. Tuberkulose der Lungen	115 - 116
52. Tuberkulose der Pleura	117 - 118
53. Tuberkulose der Peritoneum	119 - 120
54. Tuberkulose der Pericardium	121 - 122
55. Tuberkulose der Harnblase	123 - 124
56. Tuberkulose der Harnröhre	125 - 126
57. Tuberkulose der Prostata	127 - 128
58. Tuberkulose der Samenblase	129 - 130
59. Tuberkulose der Uterus	131 - 132
60. Tuberkulose der Vagina	133 - 134
61. Tuberkulose der Vulva	135 - 136
62. Tuberkulose der Perinealdrüse	137 - 138
63. Tuberkulose der Schilddrüse	139 - 140
64. Tuberkulose der Brustdrüse	141 - 142
65. Tuberkulose der Lymphknoten	143 - 144
66. Tuberkulose der Knochen	145 - 146
67. Tuberkulose der Gelenke	147 - 148
68. Tuberkulose der Haut	149 - 150
69. Tuberkulose der Augen	151 - 152
70. Tuberkulose der Ohren	153 - 154
71. Tuberkulose der Nase	155 - 156
72. Tuberkulose der Mundhöhle	157 - 158
73. Tuberkulose der Rachen- und Kehlkopf	159 - 160
74. Tuberkulose der Luftröhre	161 - 162
75. Tuberkulose der Bronchien	163 - 164
76. Tuberkulose der Lungen	165 - 166
77. Tuberkulose der Pleura	167 - 168
78. Tuberkulose der Peritoneum	169 - 170
79. Tuberkulose der Pericardium	171 - 172
80. Tuberkulose der Harnblase	173 - 174
81. Tuberkulose der Harnröhre	175 - 176
82. Tuberkulose der Prostata	177 - 178
83. Tuberkulose der Samenblase	179 - 180
84. Tuberkulose der Uterus	181 - 182
85. Tuberkulose der Vagina	183 - 184
86. Tuberkulose der Vulva	185 - 186
87. Tuberkulose der Perinealdrüse	187 - 188
88. Tuberkulose der Schilddrüse	189 - 190
89. Tuberkulose der Brustdrüse	191 - 192
90. Tuberkulose der Lymphknoten	193 - 194
91. Tuberkulose der Knochen	195 - 196
92. Tuberkulose der Gelenke	197 - 198
93. Tuberkulose der Haut	199 - 200
94. Tuberkulose der Augen	201 - 202
95. Tuberkulose der Ohren	203 - 204
96. Tuberkulose der Nase	205 - 206
97. Tuberkulose der Mundhöhle	207 - 208
98. Tuberkulose der Rachen- und Kehlkopf	209 - 210
99. Tuberkulose der Luftröhre	211 - 212
100. Tuberkulose der Bronchien	213 - 214
101. Tuberkulose der Lungen	215 - 216
102. Tuberkulose der Pleura	217 - 218
103. Tuberkulose der Peritoneum	219 - 220
104. Tuberkulose der Pericardium	221 - 222
105. Tuberkulose der Harnblase	223 - 224
106. Tuberkulose der Harnröhre	225 - 226
107. Tuberkulose der Prostata	227 - 228
108. Tuberkulose der Samenblase	229 - 230
109. Tuberkulose der Uterus	231 - 232
110. Tuberkulose der Vagina	233 - 234
111. Tuberkulose der Vulva	235 - 236
112. Tuberkulose der Perinealdrüse	237 - 238
113. Tuberkulose der Schilddrüse	239 - 240
114. Tuberkulose der Brustdrüse	241 - 242
115. Tuberkulose der Lymphknoten	243 - 244
116. Tuberkulose der Knochen	245 - 246
117. Tuberkulose der Gelenke	247 - 248
118. Tuberkulose der Haut	249 - 250
119. Tuberkulose der Augen	251 - 252
120. Tuberkulose der Ohren	253 - 254
121. Tuberkulose der Nase	255 - 256
122. Tuberkulose der Mundhöhle	257 - 258
123. Tuberkulose der Rachen- und Kehlkopf	259 - 260
124. Tuberkulose der Luftröhre	261 - 262
125. Tuberkulose der Bronchien	263 - 264
126. Tuberkulose der Lungen	265 - 266
127. Tuberkulose der Pleura	267 - 268
128. Tuberkulose der Peritoneum	269 - 270
129. Tuberkulose der Pericardium	271 - 272
130. Tuberkulose der Harnblase	273 - 274
131. Tuberkulose der Harnröhre	275 - 276
132. Tuberkulose der Prostata	277 - 278
133. Tuberkulose der Samenblase	279 - 280
134. Tuberkulose der Uterus	281 - 282
135. Tuberkulose der Vagina	283 - 284
136. Tuberkulose der Vulva	285 - 286
137. Tuberkulose der Perinealdrüse	287 - 288
138. Tuberkulose der Schilddrüse	289 - 290
139. Tuberkulose der Brustdrüse	291 - 292
140. Tuberkulose der Lymphknoten	293 - 294
141. Tuberkulose der Knochen	295 - 296
142. Tuberkulose der Gelenke	297 - 298
143. Tuberkulose der Haut	299 - 300
144. Tuberkulose der Augen	301 - 302
145. Tuberkulose der Ohren	303 - 304
146. Tuberkulose der Nase	305 - 306
147. Tuberkulose der Mundhöhle	307 - 308
148. Tuberkulose der Rachen- und Kehlkopf	309 - 310
149. Tuberkulose der Luftröhre	311 - 312
150. Tuberkulose der Bronchien	313 - 314
151. Tuberkulose der Lungen	315 - 316
152. Tuberkulose der Pleura	317 - 318
153. Tuberkulose der Peritoneum	319 - 320
154. Tuberkulose der Pericardium	321 - 322
155. Tuberkulose der Harnblase	323 - 324
156. Tuberkulose der Harnröhre	325 - 326
157. Tuberkulose der Prostata	327 - 328
158. Tuberkulose der Samenblase	329 - 330
159. Tuberkulose der Uterus	331 - 332
160. Tuberkulose der Vagina	333 - 334
161. Tuberkulose der Vulva	335 - 336
162. Tuberkulose der Perinealdrüse	337 - 338
163. Tuberkulose der Schilddrüse	339 - 340
164. Tuberkulose der Brustdrüse	341 - 342
165. Tuberkulose der Lymphknoten	343 - 344
166. Tuberkulose der Knochen	345 - 346
167. Tuberkulose der Gelenke	347 - 348
168. Tuberkulose der Haut	349 - 350
169. Tuberkulose der Augen	351 - 352
170. Tuberkulose der Ohren	353 - 354
171. Tuberkulose der Nase	355 - 356
172. Tuberkulose der Mundhöhle	357 - 358
173. Tuberkulose der Rachen- und Kehlkopf	359 - 360
174. Tuberkulose der Luftröhre	361 - 362
175. Tuberkulose der Bronchien	363 - 364
176. Tuberkulose der Lungen	365 - 366
177. Tuberkulose der Pleura	367 - 368
178. Tuberkulose der Peritoneum	369 - 370
179. Tuberkulose der Pericardium	371 - 372
180. Tuberkulose der Harnblase	373 - 374
181. Tuberkulose der Harnröhre	375 - 376
182. Tuberkulose der Prostata	377 - 378
183. Tuberkulose der Samenblase	379 - 380
184. Tuberkulose der Uterus	381 - 382
185. Tuberkulose der Vagina	383 - 384
186. Tuberkulose der Vulva	385 - 386
187. Tuberkulose der Perinealdrüse	387 - 388
188. Tuberkulose der Schilddrüse	389 - 390
189. Tuberkulose der Brustdrüse	391 - 392
190. Tuberkulose der Lymphknoten	393 - 394
191. Tuberkulose der Knochen	395 - 396
192. Tuberkulose der Gelenke	397 - 398
193. Tuberkulose der Haut	399 - 400
194. Tuberkulose der Augen	401 - 402
195. Tuberkulose der Ohren	403 - 404
196. Tuberkulose der Nase	405 - 406
197. Tuberkulose der Mundhöhle	407 - 408
198. Tuberkulose der Rachen- und Kehlkopf	409 - 410
199. Tuberkulose der Luftröhre	411 - 412
200. Tuberkulose der Bronchien	413 - 414
201. Tuberkulose der Lungen	415 - 416
202. Tuberkulose der Pleura	417 - 418
203. Tuberkulose der Peritoneum	419 - 420
204. Tuberkulose der Pericardium	421 - 422
205. Tuberkulose der Harnblase	423 - 424
206. Tuberkulose der Harnröhre	425 - 426
207. Tuberkulose der Prostata	427 - 428
208. Tuberkulose der Samenblase	429 - 430
209. Tuberkulose der Uterus	431 - 432
210. Tuberkulose der Vagina	433 - 434
211. Tuberkulose der Vulva	435 - 436
212. Tuberkulose der Perinealdrüse	437 - 438
213. Tuberkulose der Schilddrüse	439 - 440
214. Tuberkulose der Brustdrüse	441 - 442
215. Tuberkulose der Lymphknoten	443 - 444
216. Tuberkulose der Knochen	445 - 446
217. Tuberkulose der Gelenke	447 - 448
218. Tuberkulose der Haut	449 - 450
219. Tuberkulose der Augen	451 - 452
220. Tuberkulose der Ohren	453 - 454
221. Tuberkulose der Nase	455 - 456
222. Tuberkulose der Mundhöhle	457 - 458
223. Tuberkulose der Rachen- und Kehlkopf	459 - 460
224. Tuberkulose der Luftröhre	461 - 462
225. Tuberkulose der Bronchien	463 - 464
226. Tuberkulose der Lungen	465 - 466
227. Tuberkulose der Pleura	467 - 468
228. Tuberkulose der Peritoneum	469 - 470
229. Tuberkulose der Pericardium	471 - 472
230. Tuberkulose der Harnblase	473 - 474
231. Tuberkulose der Harnröhre	475 - 476
232. Tuberkulose der Prostata	477 - 478
233. Tuberkulose der Samenblase	479 - 480
234. Tuberkulose der Uterus	481 - 482
235. Tuberkulose der Vagina	483 - 484
236. Tuberkulose der Vulva	485 - 486
237. Tuberkulose der Perinealdrüse	487 - 488
238. Tuberkulose der Schilddrüse	489 - 490
239. Tuberkulose der Brustdrüse	491 - 492
240. Tuberkulose der Lymphknoten	493 - 494
241. Tuberkulose der Knochen	495 - 496
242. Tuberkulose der Gelenke	497 - 498
243. Tuberkulose der Haut	499 - 500
244. Tuberkulose der Augen	501 - 502
245. Tuberkulose der Ohren	503 - 504
246. Tuberkulose der Nase	505 - 506
247. Tuberkulose der Mundhöhle	507 - 508
248. Tuberkulose der Rachen- und Kehlkopf	509 - 510
249. Tuberkulose der Luftröhre	511 - 512
250. Tuberkulose der Bronchien	513 - 514
251. Tuberkulose der Lungen	515 - 516
252. Tuberkulose der Pleura	517 - 518
253. Tuberkulose der Peritoneum	519 - 520
254. Tuberkulose der Pericardium	521 - 522
255. Tuberkulose der Harnblase	523 - 524
256. Tuberkulose der Harnröhre	525 - 526
257. Tuberkulose der Prostata	527 - 528
258. Tuberkulose der Samenblase	529 - 530
259. Tuberkulose der Uterus	531 - 532
260. Tuberkulose der Vagina	533 - 534
261. Tuberkulose der Vulva	535 - 536
262. Tuberkulose der Perinealdrüse	537 - 538
263. Tuberkulose der Schilddrüse	539 - 540
264. Tuberkulose der Brustdrüse	541 - 542
265. Tuberkulose der Lymphknoten	543 - 544
266. Tuberkulose der Knochen	545 - 546
267. Tuberkulose der Gelenke	547 - 548
268. Tuberkulose der Haut	549 - 550
269. Tuberkulose der Augen	551 - 552
270. Tuberkulose der Ohren	553 - 554
271. Tuberkulose der Nase	555 - 556
272. Tuberkulose der Mundhöhle	557 - 558
273. Tuberkulose der Rachen- und Kehlkopf	559 - 560
274. Tuberkulose der Luftröhre	561 - 562
275. Tuberkulose der Bronchien	563 - 564
276. Tuberkulose der Lungen	565 - 566
277. Tuberkulose der Pleura	567 - 568
278. Tuberkulose der Peritoneum	569 - 570
279. Tuberkulose der Pericardium	571 - 572
280. Tuberkulose der Harnblase	573 - 574
281. Tuberkulose der Harnröhre	575 - 576
282. Tuberkulose der Prostata	577 - 578
283. Tuberkulose der Samenblase	579 - 580
284. Tuberkulose der Uterus	581 - 582
285. Tuberkulose der Vagina	583 - 584
286. Tuberkulose der Vulva	585 - 586
287. Tuberkulose der Perinealdrüse	587 - 588
288. Tuberkulose der Schilddrüse	589 - 590
289. Tuberkulose der Brustdrüse	591 - 592
290. Tuberkulose der Lymphknoten	593 - 594
291. Tuberkulose der Knochen	595 - 596
292. Tuberkulose der Gelenke	597 - 598
293. Tuberkulose der Haut	599 - 600
294. Tuberkulose der Augen	601 - 602
295. Tuberkulose der Ohren	603 - 604
296. Tuberkulose der Nase	605 - 606
297. Tuberkulose der Mundhöhle	607 - 608
298. Tuberkulose der Rachen- und Kehlkopf	609 - 610
299. Tuberkulose der Luftröhre	611 - 612
300. Tuberkulose der Bronchien	613 - 614
301. Tuberkulose der Lungen	615 - 616
302. Tuberkulose der Pleura	617 - 618
303. Tuberkulose der Peritoneum	619 - 620
304. Tuberkulose der Pericardium	621 - 622
305. Tuberkulose der Harnblase	623 - 624
306. Tuberkulose der Harnröhre	625 - 626
307. Tuberkulose der Prostata	627 - 628
308. Tuberkulose der Samenblase	629 - 630
309. Tuberkulose der Uterus	631 - 632
310. Tuberkulose der Vagina	633 - 634
311. Tuberkulose der Vulva	635 - 636
312. Tuberkulose der Perinealdrüse	637 - 638
313. Tuberkulose der Schilddrüse	639 - 640
314. Tuberkulose der Brustdrüse	641 - 642
315. Tuberkulose der Lymphknoten	643 - 644
316. Tuberkulose der Knochen	645 - 646
317. Tuberkulose der Gelenke	647 - 648
318. Tuberkulose der Haut	649 - 650
319. Tuberkulose der Augen	651 - 652
320. Tuberkulose der Ohren	653 - 654
321. Tuberkulose der Nase	655 - 656
322. Tuberkulose der Mundhöhle	657 - 658
323. Tuberkulose der Rachen- und Kehlkopf	659 - 660
324. Tuberkulose der Luftröhre	661 - 662
325. Tuberkulose der Bronchien	663 - 664
326. Tuberkulose der Lungen	665 - 666
327. Tuberkulose der Pleura	667 - 668
328. Tuberkulose der Peritoneum	669 - 670
329. Tuberkulose der Pericardium	671 - 672
330. Tuberkulose der Harnblase	673 - 674
331. Tuberkulose der Harnröhre	675 - 676
332. Tuberkulose der Prostata	677 - 678
333. Tuberkulose der Samenblase	679 - 680
334. Tuberkulose der Uterus	681 - 682
335. Tuberkulose der Vagina	683 - 684
336. Tuberkulose der Vulva	685 - 686
337. Tuberkulose der Perinealdrüse	687 - 688
338. Tuberkulose der Schilddrüse	689 - 690
339. Tuberkulose der Brustdrüse	691 - 692
340. Tuberkulose der Lymphknoten	693 - 694
341. Tuberkulose der Knochen	695 - 696
342. Tuberkulose der Gelenke	697 - 698
343. Tuberkulose der Haut	699 - 700
344. Tuberkulose der Augen	701 - 702
345. Tuberkulose der Ohren	703 - 704
346. Tuberkulose der Nase	705 - 706
347. Tuberkulose der Mundhöhle	707 - 708
348. Tuberkulose der Rachen- und Kehlkopf	709 - 710
349. Tuberkulose der Luftröhre	711 - 712
350. Tuberkulose der Bronchien	713 - 714
351. Tuberkulose der Lungen	715 - 716
352. Tuberkulose der Pleura	717 - 718
353. Tuberkulose der Peritoneum	719 - 720
354. Tuberkulose der Pericardium	721 - 722
355. Tuberkulose der Harnblase	723 - 724
356. Tuberkulose der Harnröhre	725 - 726
357. Tuberkulose der Prostata	727 - 728
358. Tuberkulose der Samenblase	729 - 730
359. Tuberkulose der Uterus	731 - 732
360. Tuberkulose der Vagina	733 - 734
361. Tuberkulose der Vulva	735 - 736
362. Tuberkulose der Perinealdrüse	737 - 738
363. Tuberkulose der Schilddrüse	739 - 740
364. Tuberkulose der Brustdrüse	741 - 742
365. Tuberk	

INHALTSVERZEICHNIS

I. Vorspann

1. Abstract
2. Liste der verwendeten Abkürzungen

II. Experimenteller Teil

1. Einführung 1 - 5
2. Theoretische Beschreibung des Testmodells 5 - 10
3. Technische Arbeitsanleitungen zu den Vorversuchen und zum zytotoxischen Test 11 - 22
 - 3.1. Anleitung zur Herstellung des BE 12 - 13
 - 3.2. Anleitung zur Herstellung des chemisch modifizierten BE = TRP-BE 13 - 14
 - 3.3. Die Vorversuche 14 - 17
 - 3.3.1. Arbeitsanleitung für den Lymphozytentransformations-test MS-Vorstudie 14 - 16
 - 3.3.2. Versuchsergebnisse der BE-LTT Vorstudie 16 - 17
 - 3.4. Arbeitsanleitung zytotoxischer Test 18 - 22
4. Präsentation der Versuchsergebnisse 23 - 37
 - 4.1. Die Patientengruppen 23
 - 4.2. Versuchsergebnisse des zytotoxischen Testes an Einzelbeispielen 24 - 30
 - 4.2.1. Die akute MS 24 - 25
 - 4.2.2. Die inaktive MS 25
 - 4.2.3. Die Normalperson 25
Abbildungen dazu 26 - 30
 - 4.3. Gesamtübersicht der einzelnen Gruppen 4.2.1.-4.2.3. sowie der Sonderfälle 30 - 33

4.4. Statistik	34 - 37
5. Diskussion der Ergebnisse	38 - 54
5.1. Das untersuchte Patientengut	38 - 39
5.2. Diskussion der technischen Grundl.	39 - 47
5.2.1. Die Trennungsmethode	39 - 40
5.2.2. Die BE Beschichtung	40
5.2.3. Die Chrommarkierungsmethode	40 - 41
5.2.4. Die Kulturdauer	41 - 42
5.2.5. Die Theorie der Zytotoxi- zität	42 - 47
5.3. Diskussion der experimentellen Testergebnisse	47 - 54
III. Literaturübersicht	55 - 100
1. Die Tiermodelle der MS	55 - 61
1.1. Die akute EAE	55 - 60
1.2. Die chronische EAE	60 - 61
2. Die Morphologie der MS	61 - 72
2.1. Die akute Läsion	61 - 67
2.2. Zusammenfassung Morphologie	68 - 70
2.3. Prinzipielles zur Demyelini- sierung	71 - 72
3. Zelluläre Immunphänomene bei der MS	72 - 81
3.1. Die B-Zellen	72 - 75
3.2. Die T-Zellen	75 - 80
3.3. Gerichtete zelluläre Phänomene bei der MS	80 - 81
4. Das BE	82 - 87
4.1. Biochemische und biologische Charakteristika des BE	82 - 83
4.2. Immunologische Charakteristika	83 - 87
5. Bisher bekannte Phänomene über eine Beteiligung des BE's bei der MS	87 - 97
6. Ausblick	98 - 100

IV. ANHANG

1. Liste der verwendeten Materialien	101 - 107
1.1 Kultur- und Waschmedien	101 - 102
1.2. Zusätze und Reagentien	102 - 103
1.3. Lösungen und Geräte	103 - 105
1.4. Der Fog Score	106 -107

V.LITERATURVERZEICHNIS

108 - 140

VI. DANKSAGUNGEN

141

VII. LEBENSLAUF

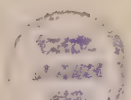
142 - 143

I. 1. A b s t r a c t

ZITZELSBERGER, MICHAEL:

ÜBER DIE ROLLE DES BASISCHEN MYELINSCHIEDENPROTEINS BEI DER MULTIPLLEN SKLEROSE (MS)

Um das Problem zu untersuchen, ob Autoimmunprozesse in der Pathoäthiologie und dem Verlauf der MS eine Rolle spielen, wurde folgendes Verfahren entwickelt und benutzt. Während eines akuten Schubs einer MS wurden 100ml peripheres Blut entnommen. Die mononukleären Zellen wurden mit Hilfe eines Ficollgradienten extrahiert und in Kultur genommen. Das Serum der Patienten wurde entfernt und durch ein menschliches Serum von Spendern der Blutgruppe AB ersetzt. Die Zellen wurden in zwei Gruppen aufgeteilt, die späteren Attacker und die späteren Targets. Die Attacker wurden mit 50 mikrogramm löslichen basischen Proteins (BE) pro 10^6 Zellen für sechs Tage stimuliert. Die Targets wurden durch Inkubation mit Phytohämagglutinin M vom 3.-6. Tag ins Blastenstadium überführt. Am Versuchstag = Tag sechs wurden die Targets mit basischem Protein beschichtet und mit radioaktivem Chrom 51 markiert. Sie sollten dadurch ein homologes, spenderhistokompatibles in vitro Modell für die Myelinzelle darstellen. Nach einer Koinkubation von Attacker- und Target Zellen über vier Stunden wurde im Überstand der jeweiligen Medien der Gehalt an Radioaktivität gemessen, der ein Maß dafür darstellt, wieviele Target Zellen von den Attackern zerstört wurden. Bei allen neun untersuchten MS Patienten im akuten Schub wurden Lysen der Target Zellen registriert, die von 4-33 Nettoprozent reichten. Acht MS Patienten in der Remission zeigten keine Lyse, desgleichen fünf Normalpersonen. Daher kommt diese Studie zu dem Schluß, daß auto-reaktive Zellen, die gegen das basische Myelinscheidenprotein des Zentralnervensystems des Menschen gerichtet sind, eine Rolle im Verlauf der MS spielen. In der vorliegenden Arbeit wird auch die relevante Literatur über die Morphologie und bisher bekannte immunologische Phänomene bei der MS zusammengefaßt.



I. 2. Liste der verwendeten Abkürzungen

- AB Serum: Serum von Spendern der Blutgruppe AB
- ADCC: Antibody dependent cellular cytotoxicity
= von Zellen mit Hilfe von Antikörpern
durchgeführte Lyse corpuskulärer Elemente
- BE: Basisches Encephalitogen
= Proteinbestandteil der Myelinscheide
- CML: Cellular mediated lympholysis
= von Zellen durchgeführte Kontaktlyse
von Lymphozyten
- DTH: Delayed type hypersensitivity
= Allergie vom verzögerten Typ
(Beispiel: Tuberkulinreaktion)
- EAE: Experimentelle allergische Encephalomyelitis
= experimentelles Tiermodell für die
Multiple Sklerose
- MHC: Major Histocompatibility Complex
= speziesspezifische Oberflächenantigene
aller Körperzellen.
- MIF: Macrophage Inhibiting Factor
= von Zellen produzierter löslicher Stoff,
der Makrophagen am Ort des Geschehens fest-
hält, indem er ihre Wanderungsgeschwindig-
keit reduziert
- MS: Multiple Sklerose
- KBR: Komplementbindungsreaktion
- PHA-M: Phytohämagglutinin Typ M
= Stoff aus einer Bohnenpflanze, der
Zellen agglutiniert und zur Mitose
anregt. Typ M = Reinheitsgrad mittel
- RPMI: Bezeichnung für ein bestimmtes Zellkultur-
medium
- TRP: Tryptophan = bestimmte Aminosäure

II. EXPERIMENTELLER TEIL

II.1. Einführung

Die Multiple Sklerose (MS) ist eine mysteriöse Krankheit, welche erst in der neueren Geschichte dokumentarisch bekundet ist, im Gegensatz zu anderen Krankheiten, die schon in alten ägyptischen Papyri beschrieben sind. (mündliche Mitteilung Prof. Schrader) Die Erkrankung ist hauptsächlich auf die weiße Bevölkerung der nördlichen Hemisphäre und ihrer Auswanderer beschränkt und stellt mit 15 Erkrankungen auf 100 000 Einwohner die häufigste neurologische Erkrankung dieser geographischen Gebiete dar. (69,S43) Allein in Deutschland gibt es 50 000 - 100 000 Erkrankte. (17, Vorwort)

"Aber die MS ist nicht nur zahlenmäßig eine wichtige Erkrankung des Zentralnervensystems. Sie ist eine Krankheit, die sich sehr früh manifestiert und gewöhnlich viele Jahre dauert. Das erzeugt medizinische, sozioökonomische und psychologische Probleme in einem Ausmaß, das durch Statistiken nicht erfaßt werden kann." (17, Vorwort).

Durch die Schwierigkeiten der Diagnosestellung, (die Diagnose ist Ausschußdiagnose und erst nach erfolgtem zweiten Schub gesichert), vergehen zum Teil Jahre wertvoller Zeit, die für eine Therapie unwiederbringlich verloren sind. Natürlich steht bei einer Erkrankung, bei der weder Ursache, noch Kriterien für die Auslösung eines Schubs bekannt sind, auch die Therapie in Frage. So bietet diese Erkrankung eine ganze Reihe brennender Probleme, auf deren Lösung Millionen Menschen warten. In der letzten Zeit hatten sich auf Grund neuerer Ergebnisse der Forschungen am tierexperimentellen Modell der Multiplen Sklerose, der EAE (experimental allergic encephalomyelitis), äußerst interessante Hinweise auf eine mögliche Entstehung der MS ergeben.

Bei den Tierversuchen kann durch Injektion eines bestimmten Gehirnbestandteiles, welcher BE (basic encephalitogen) genannt wird, ein Krankheitsbild ausgelöst werden, das klinisch und histologisch dem der MS ähnelt. (79)

Es konnte gezeigt werden, daß es sich bei dem Tiermodell um eine Autoimmunerkrankung handelt, die an die Anwesenheit von T-Lymphozyten gebunden ist, welche eine bestimmte Determinante des basischen Myelinscheidenproteins (BE) als Antigen erkennen. (18)

(Das basische Myelinscheidenprotein (BE) ist der Hauptproteinbestandteil der Nervenscheiden des zentralnervösen Axons. Diese sind bei der MS histologisch und funktionell der Ort des pathologischen Geschehens.) Die Erkrankung konnte durch einen Transfer von Zellen der T-Reihe von kranken auf gesunde Tiere übertragen werden, was mit Serumbestandteilen nicht gelang. (141/207/219/211/251/275).

Man konnte auch durch ein bestimmtes Injektionsschema den rückfallartigen Charakter der menschlichen Erkrankung nachahmen. Dabei wurden Fluktuationen der T-Zellen im Blut der Tiere beobachtet, die mit dem klinischen Stadium korrelierten. Besonders eindeutig war jeweils ein deutlicher Abfall der T-Zellen während der klinischen Symptomatik nachzuweisen. (157)

Ähnliches konnte inzwischen auch bei MS Patienten gezeigt werden. Huddlestone und Oldstone beschrieben, daß die T-Gamma Zellen im Blut von Kranken mit dem Krankheitsstadium fluktuierten. (130).

Und immer mehr Puzzlesteine wurden zusammengetragen, daß das BE auch beim Menschen eine entscheidende Rolle spielen könnte. Sheremata zeigte mit dem MIF-Assay (macrophage inhibiting factor) eine zelluläre Hypersensitivität gegen BE bei 48 MS Patienten, indem die Wanderungsgeschwindigkeit von Patientenlymphozyten in Gegenwart von BE stark reduziert war. (243)

Als interessantester und direktester Versuch, dem Zusammenhang zwischen BE und dem Immunsystem des Körpers auf die Spur zu kommen, ist die Arbeit von Frick und Stickl aus dem Jahr 1980 zu bezeichnen. Bei diesem Ansatz werden Hühnchenerythrozyten mit BE beschichtet und radioaktiv markiert und sodann von Milzzellen eines bestimmten Mäusestammes mit Hilfe von Antikörpern oder Liquor von MS Kranken lysiert. (97)

Das Ausmaß dieser ADCC (antibody dependent cellular mediated lympholysis) korreliert mit dem Krankheitsstadium der Patienten, ob aktiv oder inaktiv, ist aber unabhängig vom Typ der Erkrankung. Das heißt, man konnte auf Grund der Testergebnisse schubförmige und chronische Krankheitsverläufe nicht unterscheiden.

Einen weiteren wichtigen Aspekt bietet uns die Histologie der Multiplen Sklerose.

Wie Sie dem folgenden Schema entnehmen können (Abbildung 1, siehe S. 4) handelt es sich bei der sogenannten frühen Läsion um ein Bild, bei dem sich um Venolen des Gehirns manschettenförmige Zonen mit völliger Demyelinisierung, d.h. Fehlen von weißer Substanz, finden.

Im perivaskulären Raum und im Bereich, der sich an die demyelinisierte Zone anschließt, finden sich Ansammlungen mononukleärer Zellen, die teils aus Lymphozyten, teils aus Makrophagen, teils aus nicht näher definierbaren Zelltypen bestehen. (74/100/107/188/214/216)

Was also liegt näher, als aus dem bisher Gesagten den Schluß zu ziehen, daß es sich bei der MS um eine Autoimmunerkrankung handeln könnte, bei der körpereigene Zellen aus irgendeinem Grund das körpereigene Myelin angreifen und dabei die beschriebenen Schäden verursachen, die sich dann in dem jedem bekannten mannigfaltigen Krankheitsbild äußern können.

Ziel der vorliegenden Arbeit war es nun ein Testsystem zu entwickeln, in dem sich dieser Prozess der Zerstörung körpereigenen Myelins , b.z.w. Myelinzellen, die BE

MORPHOLOGIE DER MULTIPLER SKLEROSE

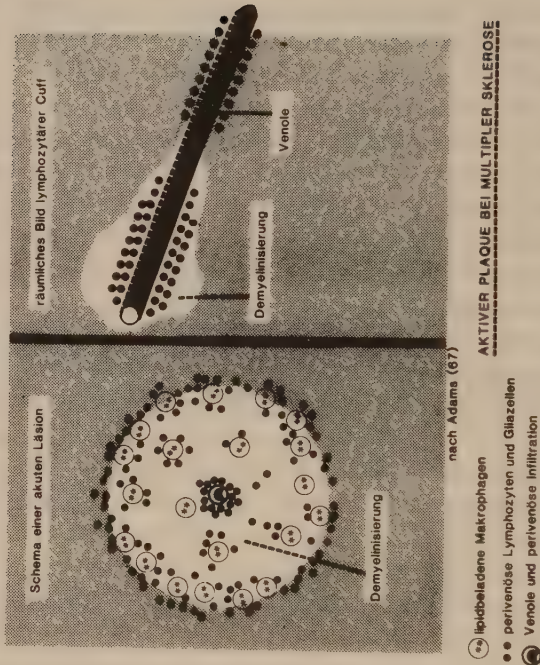


Abbildung 1:

MORPHOLOGIE DER MULTIPLER SKLEROSE

Schemazeichnung: der akute Plaque in Aufsicht und in räumlicher Darstellung

Erläuterungen in Bildlegende und vorhergehendem Text.

enthalten, im Reagenzglas nachgewiesen werden könnte. Dabei ist zu beachten, daß auf Grund der Tierexperimente nicht die Myelinzelle an sich, sondern nur ihr Hauptproteinbestandteil, das BE, Ziel des zellulären Angriffs sein dürfte.

Die Hauptschwierigkeit des Systems besteht darin, zwischen den angreifenden Zellen und den angegriffenen Zellen Histokompatibilität herzustellen, ohne auf Gehirngewebe der jeweiligen Patienten zurückgreifen zu müssen, das einzig natürlicherweise diese Voraussetzung liefern würde. Die Histokompatibilität im Testsystem zwischen Angreifer und Zielzelle ist jedoch die Voraussetzung dafür, nachzuweisen, daß das BE das Ziel des Angriffs ist, und nicht irgendwelche Alterationen der Zelloberfläche.

Obiges System konnte entwickelt werden und zeigte seine Bewährungsprobe bei der Untersuchung von 25 verschiedenen Personen, indem im Test die verschiedenen Patientengruppen ganz eigene und jeweils der Gruppenzugehörigkeit entsprechende Resultate lieferten.

II.2. Theoretische Beschreibung des Testmodells.

Es soll nun das Testsystem vorgestellt werden, das auf Grund verschiedener vorhergehender Tierexperimente und Vorversuche mit humanem Material entwickelt worden ist. Dieses Schema wurde bei Patienten mit aktiver MS, bei Patienten mit inaktiver MS und gesunden Normalpersonen unter jeweils gleichen Bedingungen durchgeführt.

Beispielhaft soll es jetzt an den Patienten im aktiven akuten Krankheitsstadium vorgestellt werden.

Diesen Personen wurden 100ml Blut in einer heparinisierten Spritze abgenommen, und sodann auf einen Ficoll Gradienten aufgeschichtet und 20min bei 2700 U/min zentrifugiert. Bei dieser nach Boyum durchgeführten Technik erfolgt eine Auftrennung der Blutbestandteile

nach ihrer Dichte.

Das oben aufschwimmende Serum wurde abgehoben und für spätere Zwecke asserviert. Die in der darunter befindlichen Schicht angesammelten mononukleären Zellen wurden abgesaugt und anschließend mehrmals in Hank's balanced salt solution gewaschen. Durch diesen Prozess sollte jede Spur vom Serum des Patienten entfernt werden, um mögliche Interferenzen von zellulären und humoralen Aktivitäten zu verhindern. Die Zellen wurden dafür mit einem gepoolten Serum von Spendern der Blutgruppe AB substituiert. Die durch obigen Trennungsprozess erhaltenen Zellen wurden sodann in zwei Gruppen geteilt, um durch verschiedene Kulturbedingungen entweder zu Angreifen oder Zielzellen heranzureifen. Wohlgemerkt handelt es sich dabei um die Zellen der gleichen Person. Sie sind also 100% histocompatibel. Die späteren Angreiferzellen oder Attacker wurden mit 50 mikrogramm löslichen basischen Proteins pro 10^6 Zellen versehen und 5-6 Tage kultiviert. Unter der Annahme, daß sich im Blut der Patienten autoimmune, dh. gegen das BE sensibilisierte Zellen befinden, sollten diese durch Zugabe ihres Antigens zur Teilung und Steigerung ihrer Aggressivität veranlaßt werden. Es konnte durch die kontrollierten Versuchsbedingungen ausgeschlossen werden, daß es dabei zu einer künstlichen, vorher nicht vorhandenen Immunitätsbildung kommt. (eigene Untersuchungen)

Die späteren Ziel- oder Target Zellen wurden zunächst ohne weitere Zusätze in Kultur genommen, am 3. Tag jedoch mit 10 mikrogramm PHA-M (Phytohämagglutinin Typ M) pro 10^6 Zellen versetzt und dann bis zum 6. Tag weiterkultiviert. Dies soll die Zielzellen ins Blastenstadium überführen. Es handelt sich hierbei um einen rein versuchstechnisch notwendigen Vorgang, da es bisher noch niemand gelungen ist, stabilisierte, inaktive Zellen zu lysieren. Vor allem wenn es sich um schwache Antigene handelt. Dies ist jedoch möglich, wenn die Zellen sich im empfindlicheren Blastenstadium befinden.

Am Versuchstag dann wurden die Zielzellen folgendermaßen aufbereitet. Nach ausgiebiger Waschung mit Hank's solution wurden die Zellen mit 1mg BE /ml Lösung für eine Stunde bei 37 Grad inkubiert. Dieser Schritt erfolgt in einer Salzlösung ohne Serumzusatz. Durch diese Hochkonzentrationsabsorbentmethode wird BE auf die Zelloberfläche physikalisch mit Hilfe elektromagnetischer Wechselwirkungen aufgebracht. Mittels radioaktiver Tracerstudien konnte gezeigt werden, daß man eine einzige Zelle durch diese Methode mit 10^7 Molekülen BE beschichten kann. Auf diese Weise hat man einen HLA identischen Ersatz für die Myelinzelle im Gehirn des betreffenden Patienten, bei der ebenfalls BE auf der Oberfläche nachgewiesen werden kann. Der Vorteil dieses Modells liegt darin, daß man auf diese Weise von jedem Patienten auf einfache Weise quasi ein lebendes, maßstabsgetreues Muster einer histokompatiblen Myelinzelle ins Reagenzglas bringen kann. Während die Zielzellen im Schüttelbad zu Abbildern von Myelinzellen aufbereitet wurden, war von den Attackern eine quadratische Verdünnungsreihe auspipettiert worden, um im Test durch verschiedene Konzentrationen eine Art Dosis-Wirkungskurve des Lyseprozesses zu erhalten. Diese Verdünnungsreihe wurde in Mikrotiterplatten auspipettiert, insgesamt vier Ansätze, um vier verschiedene Target Zellen im Versuch testen zu können. Nun letztere waren noch nicht ganz fertig. Sie mußten erst noch einen Marker erhalten, mit Hilfe dessen später ausgesagt werden konnte, ob sie den Kontakt mit den Angreiferzellen lebend oder tot überstanden hatten. Eine bekannte Methode dazu ist das Markieren mit radioaktivem Chrom 51. (245) Es handelt sich dabei um das sechswertige Natriumchromat, das als Ion die Zellmembran durchdringen kann. Intrazellulär wird es zu 70% an freilösliches Zytoplasma gebunden und dadurch zur dreiwertigen Form reduziert. (220) In dieser Form kann es die Zelle nicht mehr verlassen, es sei denn diese wird von außen attackiert und abgetötet. (220)

Dadurch verliert die Membran ihre Haltekraft, Zytosol entweicht und mit ihm das radioaktive Chrom. Nachdem der lytische Prozess abgeschlossen ist, kann man die Zellen abzentrifugieren und dann an Hand des Verhältnisses von Chrom im Überstand zu dem Chromgehalt der Zellen vor und nach dem Kontakt mit den Attackern bestimmen, wieviel Prozent der Targets dadurch zerstört wurden. Im konkreten Fall wurde also viermal die Attackerverdünnungsreihe auspipettiert und vier verschiedene Zielzelltypen dazugegeben.

Es handelte sich dabei um:

1. Targetzellen, die mit BE beschichtet und Chrom 51 markiert worden sind. Sie stellen, wie schon gesagt, ein Modell für die HLA identische Myelinzelle dar.
2. Target Zellen, die mit einem BE beschichtet wurden, das mit 2-hydroxy-5-nitrobenzylbromid behandelt worden war. Diese Substanz oxidiert das einzige im BE Molekül vorhandene Tryptophan. (12/129)
Mit einem solcherart behandelten BE kann im Tierversuch keine EAE mehr erzeugt werden. (228)
Man hat herausgefunden, daß durch die obige Substanz eine Sequenz von neun Aminosäuren um das einzige Tryptophan in seiner Antigenität blockiert wird. Diese Sequenz ist, wenn durch Enzyme aus dem BE herausgeschnitten, allein in der Lage EAE auszulösen. (112)
Dieser Ansatz, (im Schema der Abbildung 2, S.10) TRP-BE genannt, wurde durchgeführt, um Hinweise auf die Determinante des BE Moleküls zu bekommen, welche beim Menschen entscheidend für die Krankheitsauslösung ist.
3. Targets die nur mit Chrom 51 markiert waren, aber keine Beschichtung durchlaufen hatten. Dieser Ansatz war eine Kontrolle darüber, daß die Attacker keine Aktivität gegen die Basis unseres Myelinzellenmodells, dh. die histocompatible Blastenzelle entfalten.
4. Bei diesem Ansatz wurden die selben Targets verwendet, wie unter erstens beschrieben. Es wurde nur Serum von den jeweiligen Patienten dazugegeben, um zu

testen ob die Zugabe der Antikörper das im Kontrollansatz gezeigte Lysebild verändern würden.

Zu jeder Attackerverdünnungsreihe werden also diese vier Target Zellsorten dazugegeben und vier Stunden kokultiviert. Anschließend werden die Zellen abzentrifugiert und im Überstand die Radioaktivität bestimmt. Das Ausmaß der Radioaktivität korreliert mit der Zahl der lysierten Targetzellen. Aus den Meßwerten für die einzelnen Verdünnungsstufen wird durch einen bestimmten Rechengang die Dosiswirkungskurve bestimmt und diese dann auf wenige mathematische Parameter reduziert.

Das Zählgerät bestimmte automatisch mittels eines angeschlossenen Computers die Mittelwerte der zu einer Verdünnungsstufe gehörigen Probendreifachwerte.

Nach folgender Formel wurde für jede Stufe die korrigierte Lyse in Prozent berechnet:

$$\frac{(\text{Versuchsrelease} - \text{Spontanrelease})}{(\text{Maximalrelease} - \text{Spontanrelease})} \times 100 = \% \text{ korrigierte Lyse}$$

Die gewonnenen Werte wurden zuerst graphisch aufgetragen, um den Kurvenverlauf vor Augen zu führen. Um den Wert der maximalen Lyse zu ermitteln, wurde eine Parallele zur X-Achse als Tangente an den höchsten Punkt der Kurve gelegt. Der Schnittpunkt dieser Tangente mit der Y-Achse liefert den Wert der maximalen Lyse.

Um die Patientendaten untereinander besser vergleichen zu können, wurde in den Anstiegsbereich der Kurve eine Regressionsgerade gelegt und Steigung sowie Korrelationskoeffizient berechnet. So konnten die komplizierten Kurvenverläufe auf wenige Zahlen reduziert werden:

- die Steigung der Regressionsgerade
- den Wert der maximalen Lyse
- den Korrelationskoeffizienten.

In der nun folgenden Abbildung 2 wird der Versuchsablauf noch einmal schematisch verdeutlicht.

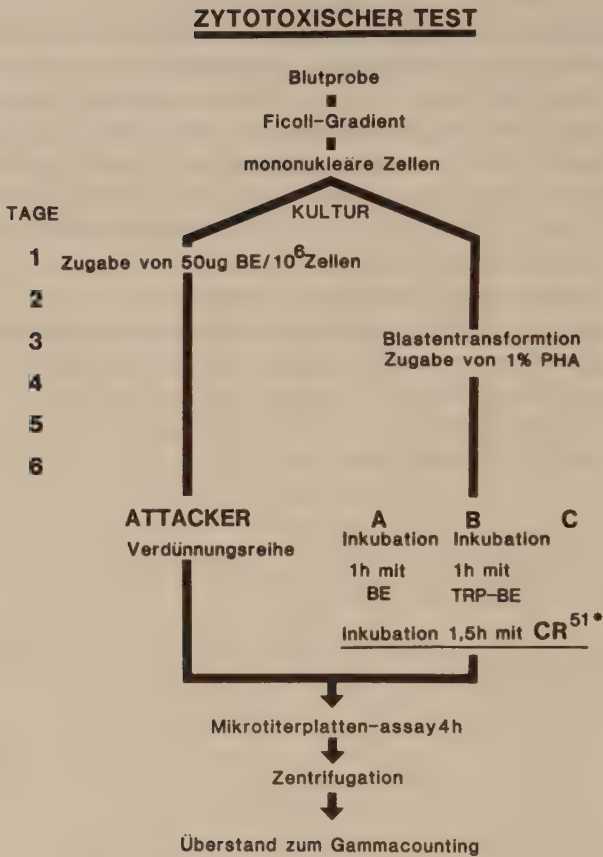


Abbildung 2: Schema des technischen Ablaufes des zytotoxischen Testes, wie er auf den Seiten 51 - 94 beschrieben ist.

Erläuterungen finden sich im Text.

II. 3. Technische Arbeitsanleitungen zu den Vorversuchen und zum zytotoxischen Test

Es folgt jetzt die Darstellung der technischen Versuchsdurchführung in allen Einzelheiten und von Beginn an.

Zuerst wird die Gewinnung des verwendeten BE's berichtet, welches aus Rinderrückenmark hergestellt wird.

Es unterscheidet sich in der Sequenz nur in einer Aminosäure von dem des Menschen. (112)

Dann folgt die Schilderung der Vorversuche mit humanem Material, welche ein Bild der optimalen Kulturbedingungen erbrachten.

Und zuletzt folgt der eigentliche Test, wie er sich nach einem Jahr mühseliger Vorarbeiten herauskristallisierte.

3.1. Anleitung zur Herstellung des BE

Unmittelbar nach dem Zerteilen frisch geschlachteter Rinder wurde das Rückenmark entfernt und in Trockeneis aufbewahrt. Im Labor wurden dann die weichen Hirnhäute entfernt. So blieben nach Wegnahme von 170 Gramm Hirnhaut noch 1170 Gramm Gewebe übrig. Dies wurde in kleine Stücke geschnitten und in flüssigen Stickstoff verbracht. In gefrorenem Zustand wurde es in einem Waring Blender zu Pulver gemahlen. Dann wurde Chloroform/Methanol im Verhältnis 2:1 in einer Menge von 7,5 Litern zugegeben und gerührt. Das pH mußte mit konzentrierter Salzsäure auf 1,8 eingestellt werden. Die Mischung wurde mit einem Magnetrührer sechs Stunden lang gerührt und dann über Nacht stehen gelassen. Es bilden sich dabei zwei Schichten aus, eine weiße unlösliche Schicht, die aufschwimmt und unten eine gelbliche Chloroform/Methanol Phase, die das Lipid enthält. Der weiße Überstand wird abgesaugt und bei 3000 U/min zentrifugiert. (4°C). Dabei bildet sich die HCl Phase mit weißlichem Überstand, darunter das restliche Chloroform/Methanol, wieder darunter ein Bodensatz schwerer und größerer Abfallprodukte. Zu sämtlichen Überständen, die nicht diese weiße Substanz enthielten, wurde noch einmal HCl dazugegeben und der Extraktionsvorgang zweimal wiederholt. Mit der weißen HCl Phase wird dann eine Eiweißfällung mit Ammoniumsulfat bis zu einer Endkonzentration von 80% Sättigung durchgeführt. Das ausgefallene Eiweiß wird zweimal gegen 10 Liter aqua dest. dialysiert und anschließend zweimal gegen 10 Liter eines Puffers aus 0,05 M Phosphat / 0,1 M NaCl, pH 7,5. Das Totalvolumen nach Dialyse betrug zwei Liter. Diese Lösung wurde über eine SE-Sephadex Säule von 2,5 x 50 cm geschickt. Die Säule wurde mit SE-Sephadex Ionenaustauscher in 50mM Natriumphosphat / 0,1 N NaCl Puffer, pH 7,5, äquilibriert. Die Proteinlösung wurde auf eine Konzentration von 3,6 mg/ml in diesem Puffer eingestellt und auf die Säule gelassen.

Es wurde mit einem logarithmischen Gradienten von zu Anfang 0.05 M Phosphat / 0,1 N NaCl (pH 7,5), zu Ende 0.05 M Phosphat / 0,53 N NaCl (pH 7,5) eluiert. Das BE befindet sich in den Fraktionen mit dem hohen Salzgehalt. Diese Fraktionen werden nach Eluation gepoolt. Die gepoolten Fraktionen werden noch einmal mit Ammoniumsulfat (80% Endsättigung) gefällt und dann in 50mM Natriumphosphat / 0,1 NaCl, pH 7,5, aufgenommen. Dieses Gemisch wurde auf eine G 150 Säule aufgebracht und mit 0,01 N HCl / 0,1 N NaCl eluiert. (Maße der Säule: 5 x 100 cm). Die Reinheit des Präparats wurde mittels einer Acrylamidgelelektrophorese überprüft. (5% iges Gel in 6 M Harnstoff). Unter den angegebenen Bedingungen ergab sich nur eine Bande. Das BE wurde anschließend gefriergetrocknet und bei -20°C aufbewahrt.

3. 2. Anleitung zur Herstellung des chemisch modifizierten BE (= TRP-BE)

Die Herstellung des TRP-BE folgte der Beschreibung, wie sie Barman und Koshland 1967 (13 / 133) zum ersten Mal beschrieben. Verwendet wurde die Modifikation nach Eylar und Hashim (89), wie folgt.

Anteilmäßig wurden 10 mg des eben in der Herstellung beschriebenen BE's in 1ml 8M Harnstoff bei pH 2,7 aufgelöst. Dazu wurde 0,1 ml einer Lösung von 5mg 2-hydroxy-5-nitrobenzylbromid in 0,1ml Aceton gegeben. Nach 10-15 min Inkubation wurde das Protein durch den Reinigungsschritt einer Sephadex G-25 Säule, die vorher mit 0,2 N Essigsäure equilibriert wurde, von überschüssigem Reagenz befreit. Eine Flowrate von ungefähr 75ml pro Stunde wurde aufrechterhalten und 1-2ml Fraktionen gesammelt. Das gesäuberte Protein wurde kombiniert und lyophilisiert. Zur Messung des Prozentsatzes der Inaktivierung wurde das Protein in 1 N KOH Lösung gebracht und bei 410 nm die Absorption bestimmt. Zur Berechnung wurde ein molarer Extinktionskoeffizient von $18\,000\text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ verwendet. Die Messung der durchgeführten Präparation ergab

eine Extinktion von 1,3, was einer Inaktivierung von 130% entspricht. Nach Koshland (129) reagiert das 2-hydroxy-5-nitrobenzylbromid spezifisch mit den Aminosäuren Tyrosin, Cystein und Tryptophan. Unter den sauren Versuchsbedingungen, wie sie in dem angegebenen Versuchsansatz herrschen, dürfte eigentlich nur Tryptophan reagieren. Da jedoch eine 130% Inaktivierung erreicht wurde, muß eine kleine Menge Thyrosin mitreagiert haben, da eine Verunreinigung mit freiem 2-hydroxy-5-nitrobenzylbromid wegen der Versuchsbedingungen auszuschließen ist. (Die durchgeführten Versuche ergaben jedoch außerdem auf der Absorptionsanalyse ein anderes Absorptionsmaximum, als angegeben, sodaß auch dadurch mögliche Berechnungsveränderungen sich ergeben würden.)

Literatur: Horton, Koshland (129), Barman und Koshland (13), Eylar und Hashim (89)

Bezüglich der Aminosäurezusammensetzung des BE: (112). Elisabeth Roboz-Einstein konnte zeigen, daß im Meer-schwein das, wie eben beschrieben, veränderte BE keine EAE produziert, und daß ferner mit TRP-BE vorimmunisierte Tiere bei einer erneuten Immunisierung mit BE vor dem Ausbrechen der Erkrankung geschützt waren.

3. 3. VORVERSUCHE

BE Stimulation von Lymphozyten

Bei den Vorversuchen sollte herausgefunden werden, in welcher Form die günstigste Stimulation mit BE zu erfolgen hat, b.z.w. Daten über eventuell toxische Konzentrationen zu erhalten. Zu diesem Zweck wurden periphere mononukleäre Zellen von MS Patienten und gesunden Kontrollpersonen einem Mikrotiterstimulationstest unterworfen.

3. 3.1. Arbeitsanleitung für den Lymphozytentransformationstest MS-Vorstudie.

Bei drei Patienten und sechs Normalpersonen wurden 100ml peripheres Blut mit einer weißen Flügelkanüle (Fa. Braun) und zwei Perfusorspritzen á 50ml mit je 1ml Heparin

entnommen. Das Blut wird in Portionen á 5ml auf je 5ml Ficoll in Polyäthylenweichplastikzentrifugenröhrchen (Fa. Greiner) aufgeschichtet und bei 2700 U/min (Zentrifuge: Hettich Rotata K) zentrifugiert. Das Serum wird abgehoben und für spätere Verwendung asserviert. Die Zellen werden ebenfalls abgehoben und zweimal mit kompletter Hank's balanced salt solution gewaschen. Die Zellen werden dann in Rohmedium ohne Serumzusatz zunächst suspendiert und in zwei Portionen aufgeteilt. Es werden zwei Zellbatches á 10^8 Zellen benötigt. Die eine Hälfte wird nun in ein Medium mit 10% AB Serum gebracht, die andere in ein RPMI Medium mit 10% autologem Serum. Beide Zellsätze werden auf 2×10^6 Zellen per ml Medium eingestellt und eine Verdünnung auf jeweils die Hälfte durchgeführt, sodaß 25ml mit einer Konzentration von 2×10^6 Zellen/ml, 25ml á 10^6 Zellen/ml und 50ml á 5×10^5 Zellen/ml zur Verfügung standen. Es werden für sechs Tage je eine Mikrotiterplatte (Fa. Nunc) nach beiliegendem Schema auspipettiert (0,2ml per well). Für die Stimulation mit BE wurden Lösungen von 50 Gamma/ml, 250 Gamma per ml, 500 Gamma/ml, 1000 Gamma/ml und 2000 Gamma/ml in Rohmedium hergestellt und je 20 mikroliter davon entsprechend dem Pipettierschema in Abbildung 7 zugeteilt. Das entspricht Stimulationen mit 5 / 25 / 50 / 100 und 200 Gamma pro 2×10^6 / 10^6 / und 5×10^5 Zellen/ml. An jedem der sechs Tage, für den Platten vorhanden sind, wird ein vier Stunden H3 Thymidin Einbau gemessen. Es werden 20 mikroliter einer 1 : 2,5 mit kompletter Hank'scher Waschlösung verdünnter H3 Thymidinlösung (Amersham Buchler, 1mCi/ml) pro well mit dem automatischen Klicker (Fa. Interchem) zugegeben und nach einer vierstündigen Inkubation bei 37°C auf -70°C tiefgefroren. Zur Auswertung werden die Zellen wieder aufgetaut und mit einer Erntemaschine (Fa. Dynatech) die Zellen auf ein Filterpapier (Fa. Whatman) aufgebracht. Dieses Filterpapier wird auf einer Heizplatte für 10min bei 60 Grad Celsius getrocknet, die vorgestanzten Plättchen aus dem Filterpapier herausgenommen und in Weichplastikszintillations-

gefäße (Fa. Interchem) gegeben. Pro Gefäß werden mittels einer automatischen Pipette (Fa. Gilson) 3ml Szintillationsflüssigkeit zugegeben. (Zusammensetzung: 5 Liter Toluol + 30g PPO und 1mg POPOP). Die Gefäße werden anschließend in einem Szintillationscounter (Fa. Packard) gezählt und von einem angeschlossenen Computer die Dreifachwerte und ihre Mittelwerte ausgedruckt. (Literatur über die H3 Thymidinmethode: 131).

3. 3.2. Versuchsergebnisse der BE-LTT Vorstudie

Als Ergebnis dieser Vorstudien kann gelten, daß eine Konzentration von 50 Mikrolitern BE pro 10^6 Zellen eine gute Konzentration zur Stimulation war. Diese zeigte bei den Normalpersonen keine toxischen oder stimulato-
rischen Effekte und bei den MS Patienten eine optimale Stimulation bis zum Faktor drei. Auch höhere Konzentrationen waren bei den Normalpersonen noch ohne Wirkung, während bei den MS Patienten die 100 Gamma Konzentration in allen Fällen schon eine depressive Wirkung aufwies. Es ergab sich weiter, daß die Verwendung von AB Serum zwar eine geringere Gesamteinbaurrate des Thymidins, d.h. auch einen geringeren Mitoseumsatz hatte, aber daß trotz dessen die gleichen Stimulationsindizes wie beim Paralellansatz mit autologem Serum auftraten.

Damit war klar, daß die Verwendung von AB Serum die immunologischen Vorgänge im Zellsystem nicht beeinträchtigte und deshalb, die aus methodischen Gründen und Vergleichbarkeitsgründen, erforderliche Verwendung von AB Serum zulässig war.

Mit dieser Methode wurden insgesamt drei MS Patienten und sechs Normalpersonen untersucht und dabei jeweils die Effekte von autologem und AB Serum getestet.

2×10^6 5 microgramm	2×10^6 25 microgramm	2×10^6 50 microgramm	2×10^6 100
2×10^6 100 microg	10^6 5 microgramm	10^6 25 microgramm	10^6 50 micro
10^6 50	10^6 100 microgramm	10^6 200 microgramm	5×10^5 5 microgramm
5×10^5 25 microgramm	5×10^5 50 microgramm	5×10^5 100 microgramm	2×10^6
2×10^6 Kontrolle	10^6 Kontrolle	5×10^5 Kontrolle	

Abbildung 7: Pipettierschema für die Vorversuche
Lymphozytentransformation durch BE

II.3.4. ARBEITSANLEITUNG ZYTOTOXISCHER TEST

Bei den untersuchten Personen wurde mittels einer weißen Flügelkanüle (Venofix G19, Fa. Braun Melsungen) eine Vene punktiert und mit zwei 50ml Perfusorspritzen derselben Firma, in denen sich je ein ml Heparin befand, 100ml Blut gewonnen. Das Blut wurde unter einem Laminarflow (CEAG Shirp Reinraumtechnik) in Portionen von je 5ml auf die gleiche Menge Ficoll 1077 aufgeschichtet. Die Zentrifugenröhrchen wurden dann 20min bei 2700 U/min in einer Hettich Rotata K Zentrifuge geschleudert. Nun wurde mittels einer sterilen Pasteurpipette das überstehende Serum abgehoben und asserviert. Die Zellen wurden aus der Zwischenschicht ebenfalls mit einer Pasteurpipette abgesaugt und in ein Falcon 50ml Zentrifugenröhrchen gegeben, das 25ml Waschlösung enthielt. (= Hanks balanced salt solution plus Zusätze.) Die Zellen wurden dann bei 1200 U/min für 10min zentrifugiert, der Überstand verworfen und die Zellen erneut mit 50ml Waschmedium aufgeschüttelt. Sodann wurden die Zellen gezählt und ihre Vitalität mit der Eosin exclusion Methode bestimmt. Die Zählung erfolgte in einer improved Neubauer Kammer. Die Vitalität betrug immer zwischen 98 und 100%. Die Zellen wurden dann im Verhältnis 2:3 aufgeteilt. Die kleinere Zellzahl sollte die späteren Attacker darstellen, die größere Zellzahl wurde für die späteren Targets benötigt. Die Zellen wurden in RPMI 1640 Kulturmedium aufgenommen. (Medium: siehe Liste der Medien. Zellen: Konzentration 10^6 /ml, maximal 20ml in einer 50ml Kulturf flasche). Zu den Attackerzellen wurden 50 mikrogramm BE pro 10^6 Zellen zugegeben. (0.1ml einer Lösung von 10mg BE pro ml in Kulturmedium). Die Kulturdauer betrug für diese Zellen sechs Tage in einem Brutschrank der Firma Heräus bei 37°C und 5% CO₂ Gehalt. Die späteren Target Zellen wurden zunächst unbehandelt in Kultur genommen. (Dieselben Bedingungen wie oben.) Am dritten Tag wurden 2ml einer Lösung von PHA-M (10 mikrogramm/ml) zugegeben, um die Zellen ins Blastenstadium zu überführen.

Die Stimulation der Target Zellen zu Blasten mittels des Phytohämagglutinins Typ M erfolgte im Prinzip nach (238). Die beschriebene Zellkonzentration von 10^6 /ml und maximal 20ml dieser Lösung pro Kulturflasche wurden in dieser Arbeit als optimal für eine PHA Stimulation beschrieben und stimmen auch mit eigenen Ergebnissen überein.

(Vergleiche auch 239). Am sechsten Tag erfolgte der Versuchsansatz. Die Attackerzellen wurden zweimal mit Waschlösung gewaschen und sodann in Kulturmedium auf $2,5 \times 10^6$ Zellen pro ml eingestellt. Die Target Zellen wurden ebenfalls zweimal mit Hanks Waschlösung gewaschen. Von den Attackern wurde eine Verdünnungsreihe mit quadratischem Abstand erstellt und von den 6-8 Stufen je 0,2ml in Dreifachwerten in Mikrotiterplatten ausplattiert. Für jede Target Sorte war eine eigene Platte erforderlich. Zu den in Hanks Lösungen gewaschenen Targets wurde eine Lösung von 1mg/ml in Rohmedium plus Zusätze, aber ohne Serum, zu je 10^7 Zellen zugefügt und die Zellen eine Stunde auf einem Wobbler der Firma IKA bei 1 mal/sec und Ausschlag 1mm geschüttelt. Dies geschah im Brutschrank bei 37°C und 5% CO_2 . Die Target Zellen, die nur mit Chrom markiert werden sollten, wurden in Hanks Lösung mitgeschüttelt. Nach einer Stunde Inkubation wurden die Zellen mit serumhaltigem Kulturmedium gewaschen. (2x durchführen). Jetzt wurden 100 mikroCurie pro 10^7 Zellen radioaktives Natriumchromat 51 in physiologischer Kochsalzlösung zugegeben und unter den gleichen Bedingungen wie vorher inkubiert. Danach wurden die Zellen mit je 10ml Kulturmedium gewaschen. (2x durchführen). Nach dem Zentrifugieren wurde jeweils aus dem Überstand eine Probe entnommen und in den Gamma Counter gegeben, um den Reinheitsgrad, der durch die Waschungen erreicht wurde, zu prüfen. Zum Teil wurden Ansätze durchgeführt, in denen mit Jod 125 markiertes BE für die Beschichtung verwendet wurde. Mittels einer selektiven Doppelisotopenmessung konnte festgestellt werden, daß die Prozedur in der Lage ist, 10^7 - 10^{10} Moleküle des BE auf eine einzige Zelle aufzubringen. Die Attackerzellen, die auf eine Mikro-

titerplatte auspipettiert wurden (Fa. Nunc), wurden in der Zwischenzeit im Brutschrank bereitgehalten. In diese Mikrotiterplatten wurde nach ihrer Fertigstellung mittels einer automatischen Pipette (Fa. Interchem) je 20 Mikroliter einer auf 5×10^5 /ml eingestellten Target Zellpopulation hinzugegeben. Alle Zahlenangaben beziehen sich auf vitale Zellen. Die Vitalität sollte bei den Target Zellen nach dem Markieren zwischen 60 und 70% liegen. War das nicht der Fall, so wurden die Zellen noch einmal über Ficoll geschickt. Diese Prozedur ist nach Boyum (32) in der Lage, lebende von toten Zellen zu trennen. Insgesamt liefen in den meisten Tests vier Ansätze, (in Abhängigkeit von der vorhandenen Zellzahl):

- Attacker gegen BE beschichtete Targets
- Attacker gegen BE beschichtete Targets plus Patientenserum
- Attacker gegen Targets, die mit 2-hydroxy-5-nitrobenzylbromid modifiziertem BE beschichtet waren
- Attacker gegen nur mit Chrom 51 markierte, unbeschichtete Targets

Neben den Kontrollen mit dem Spontanrelease in nur mit Medium gefüllten Wells der Mikrotiterplatten für die einzelnen Target Sorten, wurde noch der Maximalrelease bestimmt. Maximalrelease ist 20 Mikroliter Target Zellen aller drei Sorten plus Zugabe von 0,2ml einer 5%igen Triton X100 Lösung, einem Detergens. Außerdem wurde eine Probe der 20 Mikroliter Targets allein in ein Zählgefäß gebracht. Das Auspipettieren des Spontanrelease, d.h. des Betrags an Radioaktivität, den die Zellen über eine gewisse Zeit ganz spontan an das Medium abgeben, am Anfang und am Ende der Versuchsserie hatte folgenden Sinn.

Da das Ernten der gesamten Platte drei bis vier Minuten in Anspruch nimmt und ein Wert für den Spontanrelease am Anfang und einer am Ende liegt, kann man damit feststellen, ob sich in der Zwischenzeit des Erntens noch Veränderungen im Assay ergeben haben, die berücksichtigt werden müssen. Der Maximalrelease ist ein Maß dafür, wie-

viel Radioaktivität sich erhalten läßt, wenn die Zellen durch ein Detergens aufbrechen und ihren radioaktiven Inhalt ins Medium verströmen. Das Zählen der Zellproben fertiger Targets ermöglicht es, nach Abzug der im Medium durch Spontanrelease und Zählungen der Waschflüssigkeit erhaltenen Radioaktivität, festzustellen, wieviel Radioaktivität sich überhaupt auf den Zellen befindet.

Nachdem die Assays komplett auspipettiert sind, werden die Zellen bei 500 U/min für 5 min. leicht anzentrifugiert und dann vier Stunden in den Brutschrank gestellt. Nach den vier Stunden werden die Zellen bei 1000 U/min abzentrifugiert und von den 0,2 ml Überstand je 0,1 ml mittels einer 12 Kanalpipette (Fa. Flow) entnommen. Die abgesaugte Flüssigkeit wird in Mikroreaktionsgefäße der Firma Greiner gegeben. Die Gefäße werden verschlossen und in spezielle Plastikzählgefäße gesteckt, die auf die Maße des Gamma-Counters eingemessen sind.

Der Gamma-Counter wird mit einem Eichstab geeicht und durch Messen einer Probe das interessierende Strahlenspektrum dem Gerät eingegeben. Alles weitere geschieht selbsttätig. Es wurde eine Zählzeit von 10 Minuten pro Einzelprobe für ausreichend gehalten.

Spontan	$2,5 \times 10^6$	$1,25 \times 10^5$	
6×10^5	3×10^5	$1,5 \times 10^5$	
7×10^4	$3,5 \times 10^4$	$1,7 \times 10^4$	
$0,85 \times 10^4$	$0,42 \times 10^4$	Spontan	

Abbildung 8: Pipettierschema zytotoxischer Test
Erläuterungen im Text

II. 4. PRÄSENTATION DER VERSUCHSERGEBNISSE

Mir dem, wie man gesehen hat, in der technischen Durchführung sehr aufwendigen Verfahren wurden dann verschiedene Patientengruppen untersucht, deren Zusammensetzung man der folgenden Tabelle entnehmen kann.

4.1. Tabelle IX: Patientengruppen

- Patienten im akuten Schub einer MS
Es wurden 9 Patienten im akuten Schub untersucht, davon 4 mit einer gesicherten MS nach den Kriterien von McAlpine (69, S.5) und 5 mit einer wahrscheinlichen MS nach McAlpine.
- Patienten in der Remission
Es wurden 8 Patienten in einer stabilen Remission ohne neu aufgetretene neurologische Symptome untersucht. Die Diagnose war bei allen Patienten nach McAlpine gesichert.
- Normalpersonen
Es wurden fünf gesunde Normalpersonen untersucht.
- Patienten mit Sonderkriterien
Diese Gruppe umfaßte 4 Patienten.
 - eine Patientin mit nicht definierter Klinik, die unter der Differentialdiagnose MS oder eine Zoonose des Zentralnervensystems angeboten wurde.
 - ein Hirntumorpatient nach Operation
 - eine MS Patientin mit gesicherter Diagnose nach dreiwöchiger Cortisonbehandlung
 - eine Patientin mit chronisch progredientem Verlauf

II. 4.2. Versuchsergebnisse des zytotoxischen Tests an Einzelbeispielen

Jede nun klinisch definierte Patientengruppe zeigte im Versuchsablauf eine ganz charakteristisch verlaufende Kurve, die exemplarisch an Hand von einzelnen Beispielen demonstriert wird.

4.2.1 Die akute MS

In der Abbildung 3: CML peripherer Lymphozyten eines Patienten mit akuter MS wird an Hand eines typischen Beispiels gezeigt, wie der Kurvenverlauf eines Assays gegen BE beschichtete Targets üblicherweise aussieht. Es handelt sich bei der durchgezogenen Linie um den Auftrag der Werte der korrigierten Lyse, wie sie sich aus der Berechnung der Chromiumreleasewerte der einzelnen Verdünnungsstufen ergab. In den Steilanstieg der Kurve wurde eine Regressionsgerade gelegt, um die Steilheit des Anstiegs mit der der anderen Patienten vergleichen zu können. Die Regressionsgerade bezieht als letzten Wert den mathematischen Gipfelpunkt der Kurve mit ein. Dieser Gipfel, der gleichzeitig den Punkt der maximalen Lyse darstellt, wurde ermittelt, indem eine Parallele zur X-Achse von oben an die Kurve gelegt wurde (geschlängelte Linie). Der Wert der maximalen Lyse ergibt sich dann aus dem Schnittpunkt der Tangente mit der Y-Achse. Der oberste Punkt der Regressionsgerade ist mit dem Schnittpunkt der Tangente erreicht und stellt den Wert der maximalen Lyse dar.

Die Plateaubildung der Kurve kommt nicht bei allen Patienten so ausgeprägt zur Darstellung. Wie im Literaturteil besprochen, machen sich in den hohen Konzentrationsbereichen Überladungseffekte bemerkbar, die verhindern, daß die Attackerzellen mit ihren Target Zellen in Kontakt kommen. Wenn sich in diesen Bereichen ein Abfall des Plateaus ergibt, so ist er direkt konzentrationsabhängig.

In der Abbildung 4: CML peripherer Lymphozyten eines Patienten mit akuter MS werden die Regressionsgeraden an Hand eines anderen Beispiels aus den Assays gegen BE Targets und gegen nur mit Chrom 51 markierte, aber unbeschichtete Targets gegenübergestellt. Bei keiner der Patienten und Kontrollpersonen fand sich eine Lyse dieser unbeschichteten autologen Zellen. Die Chromkurve (gestrichelt) verläuft fast immer, wie in diesem Bild, parallel zur X-Achse. Nur in wenigen Fällen findet sich ein leichter Anstieg oder auch ein leichter Abfall gegen die hohen Konzentrationsbereiche zu. Diese leichten Veränderungen sind jeweils durch die individuelle Empfindlichkeit der Target Zellen auf die Behandlungs- und Assaybedingungen verursacht. In allen Fällen ließ sich ein deutlicher Unterschied zum Verlauf der BE Kurve feststellen, die immer durch ihre starke Steigung imponierte.

4.2.2 Die inaktive MS

Abbildung 5: CML peripherer Lymphozyten eines Patienten mit inaktiver MS

Bei den Patienten im Remissionsstadium fand sich durchwegs das Bild, wie es Patient K. 22 J. in Abbildung 5 zeigt. Bei allen Target Typen verlaufen die Geraden mehr oder weniger parallel zur X-Achse.

4.2.3 Normalperson

Abbildung 6: CML peripherer Lymphozyten einer Normalperson

Die Kurven der Normalpersonen und der inaktiven Patienten unterscheiden sich nicht wesentlich voneinander. Keine der Targets wurde lysiert.

CML peripherer Lymphozyten eines Patienten mit akuter MS

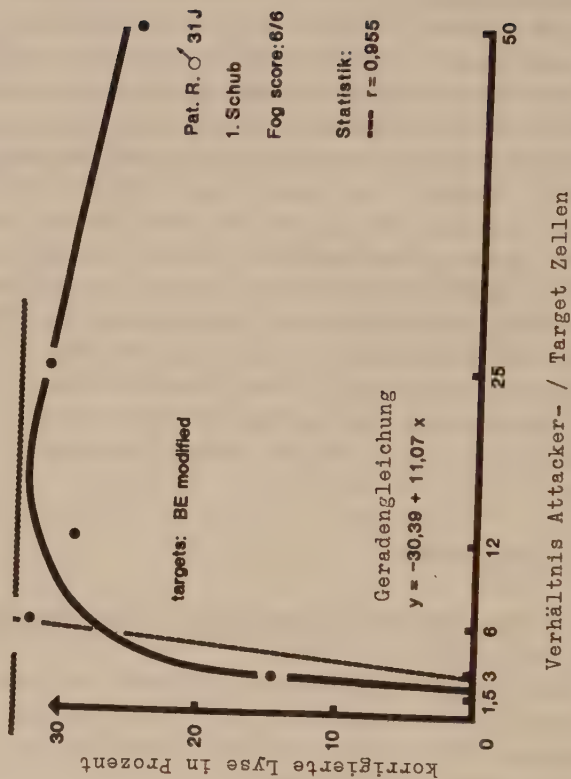


Abbildung 3: CML= cellular mediated lympholysis
 Graphische Auftragung der Prozentlysewerte (Punkte), wie sie sich aus den Mittelwerten des Dreifachansatzes zu jeder Verdünnungsstufe ergaben. Assay gegen BE beschichtete Targets, mit Chrom 51 markiert, ohne Verwendung von autologem Serum. In der Abbildung sind auch die Prinzipien der rechnerischen Aufarbeitung dargestellt. Geschlängelte Linie = Parallele zur Ermittlung der maximalen Lyse; ----- = Regressionsgerade; Text s.S.24.

AKTIVE MS

CML peripherer Lymphozyten eines Patienten
mit akuter MS

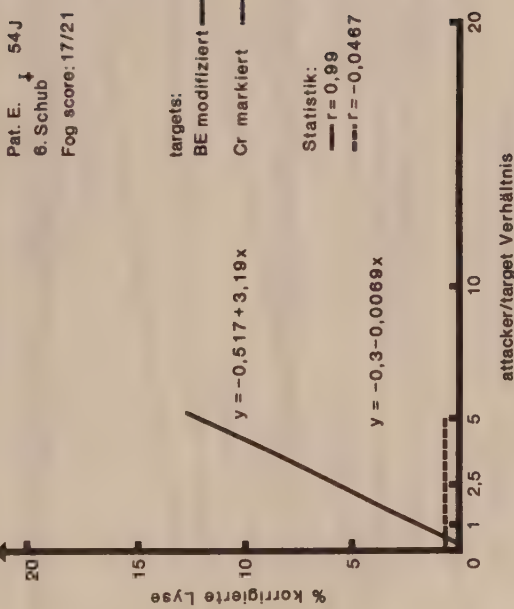


Abbildung 4: Gegenüberstellung der Regressionsgeraden bei einem Patienten im akuten Schub

- Regressionsgerade des Ansatzes gegen BE beschichtete Targets
- Regressionsgerade des Ansatzes gegen unbeschichtete, nur mit Chrom 51 markierten Targets

INAKTIVE MS

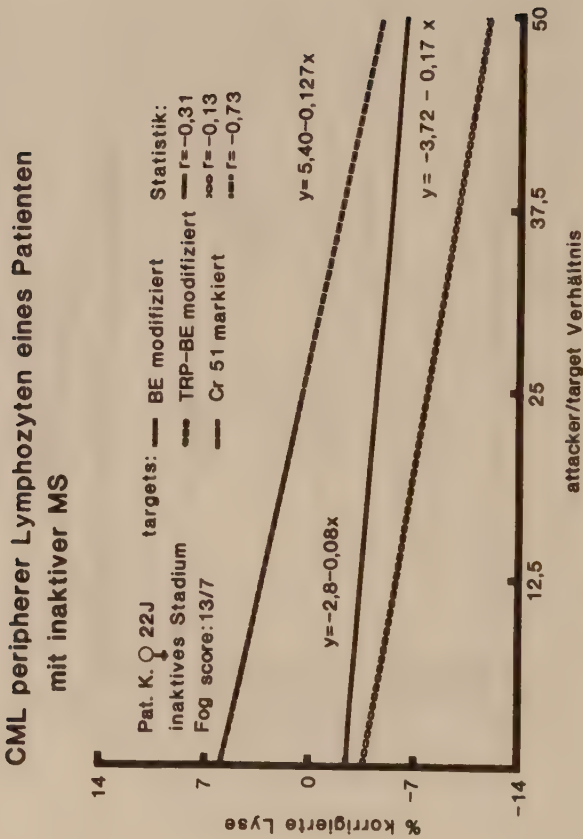


Abbildung 5: Darstellung der Regressionsgeraden gegen die verschiedenen Target Typen bei einem Patienten mit inaktiver MS.

Zeichenerklärung in der Bildlegende.

Text S.25

NORMAL PERSON

CML peripherer Lymphozyten einer Normalperson

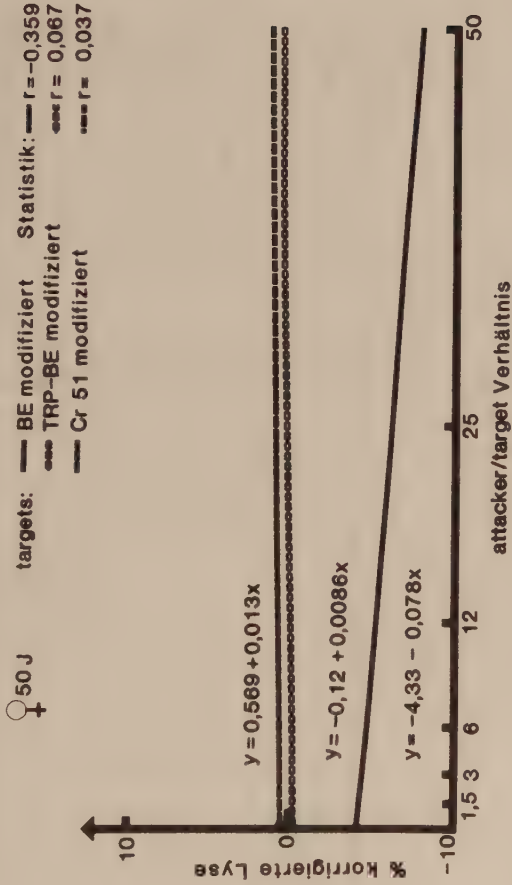


Abbildung 6: Darstellung der Regressionsgeraden gegen alle Target Typen bei einer Normalperson
 Zeichenerklärung in der Bildlegende
 Text S. 25

Es folgen nun die Ergebnisse als Gesamtübersicht über die einzelnen Gruppen.

Im ersten Teil der Tabellen sind jeweils die klinischen Parameter aufgezeigt: Geschlecht, Alter, Zahl der bisher durchgemachten Schübe, (umfaßt bei den akuten Patienten auch den aktuellen Schub) und die Werte der Fog-Skala. Dies ist ein Punktesystem, das neurologischen Ausfällen für die rechte und linke Körperhälfte getrennt, nach einem Katalog Zahlenwerte zuordnet. (94).

Dies geschah, um die klinischen Varianten des Krankheitsbildes miteinander vergleichen zu können.

In der letzten Spalte der Tabelle findet sich der Wert der maximalen Lyse gegen die BE beschichteten Targets. Diese Werte wurden auf die vorher beschriebene Art und Weise errechnet.

Es zeigte sich bei keiner Gruppe eine Lyse der nur mit Chrom markierten autologen Kontrolltargets.

Desgleichen gab es in den Assays, bis auf zwei Ausnahmen, keine Lyse gegen Targets, die mit Trp-BE beschichtet waren. Dies liefert starke Hinweise darauf, daß auch beim Menschen die hauptantigene Determinante die Region um das essentielle Tryptophan sein könnte.

4.3.1 AKUTE MS

Geschlecht	Alter	Schubzahl	Fog-Score	maximale Lyse gegen BE
w	24	1	5/0	25
m	27	1	6/2	33
w	30	1	13/11	4
m	31	1	6/6	31
w	40	1	6/5	26
m	49	2	26/22	12
w	46	3	10/6	11
w	52	4	33/32	7
w	54	6	17/21	15

Tabelle X: Zusammenschau der Ergebnisse aller Patienten aus der Gruppe A: Patienten während eines akuten Schubs der Multiplen Sklerose

Erläuterungen im Text S. 30

4.3.2 INAKTIVE MS

Geschlecht	Alter	Schubzahl	Fog-Score	maximale Lyse gegen BE in %
w	22	pgr.	13/ 7	0
w	33	5	14/15	0
w	38	8	9/16	0
w	40	pgr.	4/3	0
w	44	5	10/12	0
w	47	2	n.d.	0
w	48	6	12/19	0

Tabelle XI: Zusammenschau der Ergebnisse aller Patienten der Gruppe B: Patienten im inaktiven Stadium einer Multiplen Sklerose
Text S. 30

4.3.3 GESUNDE KONTROLLPERSON

Tabelle XII: Zusammenschau der Ergebnisse der Gruppe C:
Text S. 30

Geschlecht	Alter	maximale Lyse gegen BE in %
m	24	0
w	25	0
w	33	0
w	50	0
w	50	0

4.3.4 SONDERFÄLLE

Tabelle XIII: Zusammenschau der Ergebnisse der Gruppe D:
Text S.30

Geschlecht	Alter	Fog-Score	Anmerkungen
w	38	3/16	0% nach drei Wochen Cortisontherapie
m	35	n.d.	Hirntumor nach OP 0% gegen BE
w	50	11/ 7	klinische Diagnose nicht definiert; 10% Lyse
w	41	22/25	0% chronischer Verlauf

III. 4.4 STATISTIK

Abschließend zur Präsentation der Ergebnisse sollen in tabellarischer Form die Regressionsgeraden für alle Target Typen bei allen Patienten, einschließlich der Korrelationskoeffizienten, dargestellt werden.

Abkürzungen:

BE = BE beschichtete Targets

TRP= TRP-BE beschichtete Targets (BE ist an der Tryptophanposition oxidiert)

Au = BE beschichtete Targets plus Zugabe autologen Serums der jeweiligen Patienten

Cr = nur mit Chrom 51 markierte Targets

Tabelle XIV: Aktiver Schub einer MS

Pat. Ka. BE:	$y = -8,12 + 6,39 x$	$r = 0,95$
Au:	$y = -24,8 - 0,42 x$	$r = -0,8$
Cr:	$y = 4,55 + 0,47 x$	$r = 0,061$
TRP:	$y = 27,9 - 0,55 x$	$r = -0,39$

Pat. Ed. BE:	$y = -0,52 + 3,19 x$	$r = 0,99$
Au:	nicht durchgeführt	
Cr:	$y = -0,3 - 0,0069 x$	$r = -0,0047$
TRP:	nicht durchgeführt	

Pat. Th. BE:	$y = 1,45 + 0,97 x$	$r = 0,714$
Au:	nicht durchgeführt	
Cr:	$y = -14,7 + 0,27 x$	$r = 0,248$
TRP:	nicht durchgeführt	

Pat. Sc. BE:	$y = -3,87 + 0,57 x$	$r = 0,61$
Au:	$y = -4,13 + 0,57 x$	$r = 0,859$
Cr:	$y = -76,9 + 2,7 x$	$r = 0,90$
TRP:	$y = 15,24 - 0,96 x$	$r = -0,43$

Pat. Vo. BE:	$y = -5,24 + 1,3 x$	$r = 0,98$
Au:	$y = -2,7 + 9,9 x$	$r = 0,96$
Cr:	$y = 39,25 - 2 x$	$r = -0,669$
TRP:	nicht durchgeführt	

Pat. Ku. BE: $y = 3,8 + 1,35 x$ $r = 0,898$
 Au: $y = -102 + 9,68 x$ $r = 0,976$
 Cr: nicht auswertbar, da Spontan = Maximal
 TRP: hat Sonderverlauf, keine Regression

Pat. Re. BE: $y = -30,4 + 11 x$ $r = 0,955$
 Au: $y = -11,3 + 3 x$ $r = 0,978$
 Cr: nicht auswertbar, da Spontan = Maximal
 TRP: " " " "

Pat. Ha. BE: $y = -28,7 + 97,6 x$ $r = 0,836$
 Au: nicht durchgeführt
 Cr: $y = 35,78 - 1,8 x$ $r = -0,91$
 TRP: $y = 2,96 - 1,34 x$ $r = -0,52$

Pat. He. BE: $y = -9 + 6,6 x$ $r = 0,899$
 Au: $y = -26,2 + 3,67 x$ $r = 0,985$
 Cr: $y = -1,2 - 0,097 x$ $r = -0,1$
 TRP: $y = -13,67 - 0,24 x$ $r = -0,313$

Tabelle XV

Patienten mit inaktiver MS

Pat. Gu. BE: $y = -0,039 + 0,08 x$ $r = 0,29$
 Au: $y = 3,34 - 0,1 x$ $r = -0,2$
 Cr: $y = 2,55 - 0,031 x$ $r = -0,27$
 TRP: $y = 105,27 - 2,87 x$ $r = -0,40$

Pat. Ki. BE: $y = -2,8 - 0,08 x$ $r = -0,31$
 Au: nicht durchgeführt
 Cr: $y = 5,4 - 0,127 x$ $r = -0,13$
 TRP: $y = -3,7 - 0,017 x$ $r = -0,13$

Pat. Ha. BE: $y = -36 + 0,18 x$ $r = -0,19$
 Au: $y = -43 - 0,63 x$ $r = -0,41$
 Cr: $y = -3,2 + 0,22 x$ $r = -0,68$
 TRP: $y = 3,57 - 0,154 x$ $r = -0,788$

Pat. Ri. BE: $y = -20,85 - 0,24 x$ $r = -0,138$
 Au: $y =$ nicht durchgeführt
 Cr: $y = -3,2 + 0,097 x$ $r = 0,091$
 TRP: nicht durchgeführt

Pat. Ma. BE: $y = 7 - 1,17 x$ $r = -0,31$
 Au: $y = 1,96 + 1,28 x$ $r = 0,66$
 Cr: $y = 3,27 + 2,16 x$ $r = 0,75$
 TRP: nicht durchgeführt

Pat. Ba. BE: $y = -7,44 + 0,036 x$ $r = 0,136$
 Au: nicht durchgeführt
 Cr: $y = -0,159 - 0,17 x$ $r = -0,35$
 TRP: nicht durchgeführt

Pat. Mu. BE: $y = -4,4 + 0,16 x$ $r = 0,56$
 Au: $y = -4,2 + 0,065 x$ $r = 0,249$
 Cr: $y = -1,8 - 0,07 x$ $r = -0,42$
 TRP: $y = 1,128 + 0,054 x$ $r = 0,22$

Tabelle XVI.

Gesunde Normalpersonen

NP. Mi. BE: $y = -1,2 + 0,91 x$ $r = 0,98$
 Au: nicht durchgeführt
 Cr: $y = -1,06 + 0,87 x$ $r = 0,925$
 TRP: nicht durchgeführt

NP. Ga. BE: $y = -2,74 - 0,029 x$ $r = -0,59$
 Au: nicht durchgeführt
 Cr: $y = 1,11 - 0,108 x$ $r = -0,25$
 TRP: nicht durchgeführt

NP. MO. BE: $y = 6,28 - 0,19 x$ $r = -0,65$
 Au: nicht durchgeführt
 Cr: $y = 15 + 0,022 x$ $r = 0,07$
 TRP: $y = -11,42 + 0,115 x$ $r = 0,38$

NP. MX. BE: $y = -4,33 - 0,078 x$ $r = -0,36$
 Au: nicht durchgeführt
 Cr: $y = 0,569 + 0,013 x$ $r = 0,0378$
 TRP: $y = -0,12 + 0,013 x$ $r = 0,0378$

NP. Su. BE: $y = -0,45 - 0,011 x$ $r = -0,10$
 Au: nicht durchgeführt
 Cr: $y = 1,08 - 0,03 x$ $r = -0,25$
 TRP: nicht durchgeführt

Tabelle XVII

Sondergruppe

Pat. Ko. BE: $y = -31 + 0,79 x$ $r = 0,049$
 Au: $y = -50 + 5,34 x$ $r = 0,79$
 Cr: $y = 0,35 - 0,29 x$ $r = -0,42$
 TRP: nicht durchgeführt

Pat. Ka. BE: $y = -4,4 + 0,16 x$ $r = 0,62$
 Au: nicht durchgeführt
 Cr: $y = -0,68 - 0,116 x$ $r = -0,148$
 TRP: nicht durchgeführt

Pat. Ha. Sonderverläufe aller Kurven, keine Regression

Pat. Ma. BE: $y = -4,40 + 0,16 x$ $r = 0,56$
 Au: $y = -4,2 + 0,065 x$ $r = 0,249$
 Cr: $y = -1,8 - 0,07 x$ $r = -0,416$
 TRP: $y = 1,128 + 0,054 x$ $r = 0,22$

II.5 DISKUSSION DER ERGEBNISSE

5.1. Das untersuchte Patientengut

Es sollte nachgewiesen werden, ob im akuten Schub einer MS autoreaktive Zellen vorhanden sind, die sich, wie bei der EAE des Meerschweinchens, gegen BE richten. (18)
Deswegen sollten Patienten im akuten Schub untersucht werden. Akuter Schub wurde nach Schuhmacher et al. (69, S.8) so definiert: "eine Verschlechterung bestehender neurologischer Symptome, oder die Ausbildung eines neuen Symptoms, oder einer Symptomengruppe, über wenigstens 24 Stunden, vorausgesetzt, daß der Verlauf wenigstens einen Monat lang vorher stationär war, oder sich verbesserte."

Als klinische Kriterien wurden die von McAlpine verwendet, um die Diagnose MS auf eine grundsätzliche Basis zu stellen.

- " definite MS" : "Wenn wenigstens zwei Schübe stattgefunden haben, die Hinweise auf multiple Läsionen im Gehirn zulassen."
- " probable MS" : "Bei einem einzelnen MS Schub, der zu Beginn bereits Hinweise auf multiple Läsionen im Gehirn gibt, d.h. dessen Klinik die Verdachtsdiagnose MS sehr wahrscheinlich macht. Nach dem Schub schnelle Rückbildungstendenz."
- " possible MS" : "bei progressiver Anamnese; ungenügender Nachweis multipler Läsionen; Andere Ursachen ausgeschlossen, oder Klinik so ähnlich wie bei probable MS, aber unüblichen Erscheinungsbildern, wenig greifbaren Symptomen; ungenügender follow up."

(69)

Die letztere Kategorie ist in der vorliegenden Studie nicht enthalten. Zuerst war nur beabsichtigt, Fälle aus der Diagnosegruppe "definite MS" zu verwenden. Es war jedoch aus organisatorischen Gründen nicht möglich

ausreichend Fälle dieser Art zu finden, sodaß auch die Gruppe " probable MS " mit in die Studie aufgenommen wurde. Die Patienten wurden seitens der Klinik gemeldet, sobald man sich über die Diagnosegruppe im Klaren war. Sodann erfolgte von meiner Seite die Blutentnahme und die Evaluation des Fog-Score nach einer Untersuchung des Patienten. (94) (Schema des Score im Anhang). Die Patienten erhielten mit Ausnahme dort, wo es angegeben ist, zum Zeitpunkt der Blutentnahme keine Medikamente.

Es sind nun folgende Patientengruppen in der Studie enthalten:

- Diagnose MS gesichert; akuter Schub
- Diagnose MS wahrscheinlich; akuter Schub
- Diagnose MS gesichert; Remission
- gesunde Normalperson
- Sonderfälle: Patienten mit anderen neurologischen Erkrankungen und unklare Diagnosen

II. 5.2. DISKUSSION DER TECHNISCHEN GRUNDLAGEN

5.2.1 Die Trennungsmethode

Zur rein technischen Seite ist folgendes zu sagen.

Die Auftrennung menschlichen Blutes mittels der Dichtegradientenzentrifugation mit Ficoll 1077 ist in der Arbeit von Boyum beschrieben (32).

Die Zentrifugation von Heparinblut liefert folgendes Bild:

0,8 %	Granulozyten	
81,2 %	Lymphozyten	
17,4 %	Monozyten	
0,6 %	Basophile	bezogen auf 100 korpus-
2,6 %	Erythrozyten	kuläre Elemente

Da Granulozyten nur eine Lebensdauer von 1-2 Tagen haben, befinden sich am Ende der sechstägigen Kultur ca. 85 % Lymphozyten und ca. 15 % Makrophagen in den Kulturmedien.

Nach eigenen Untersuchungen (Zellfärbungen an auseinandergebrochenen Kulturflaschen) zeigt sich, daß ca. 5 % der Zellen an den Wänden hängen bleiben und sich durch normale Waschung nur geringfügig von den Wänden ablösen lassen und somit für den Versuchsansatz verlorengehen.

Mit der Ficolltechnik können auch lebende von toten Zellen getrennt werden.

5.2.2 Die BE Beschichtung der Targets

Dazu gibt es keine relevante Literatur. Über das Ausmaß des an menschliche Lymphozyten bindbaren BE, gaben eigene Studien mit Jod 125 Tracern Auskunft. Diese Studien sind noch nicht veröffentlicht. Sie zeigen, daß man mit der beschriebenen Methode ca. 10^7 Moleküle des BE auf eine einzige Zelle aufbringen kann.

5.2.3 Die Chrommarkierungsmethode

Die Methode des Chromiumreleaseassay wurde im Prinzip nach Simpson (245) durchgeführt und nach Schendel (238) modifiziert. Da eigene Versuche ergaben, daß eine Markierung mit 100 mikro Curie ausreichend ist, um gute Zählausbeuten der Radioaktivität zu erhalten, wurde aus Gründen sparsamen Umgangs mit Radioaktivität von den Arbeitsanleitungen abgewichen.

Rajam und Jackson (220) untersuchten die Chrommarkierung von Karzinomzellen in Aszites von Ehrlich Mäusen. Sie fanden dort, daß 71 % der Radioaktivität mit löslichem Zytoplasma assoziiert ist, sowie einen sicher nachweisbaren Anteil freier $\text{Cr } 3+$ Ionen in der Zelle, was nahelegt, daß die ursprünglich sechswertigen Chrommoleküle intrazellulär reduziert werden und in diesem Zustand die Zellmembran nicht mehr nach außen durchdringen können. In Lit. (47) gibt es Hinweise darauf, daß eine Inkubation von 90 min. ausreichend ist, um optimale Markierungen zu erhalten, sowie daß Waschungen einmal markierter Zellen keinen Einfluß auf den Markergehalt haben.

Obwohl das meiste Material über Chrommarkierung von Zellen aus Untersuchungen mit Erythrozyten stammt, so zeigen doch die Befunde dieser Untersuchung, daß sich die Sachverhalte im Prinzip auch auf andere Blutzellen übertragen lassen. Über die Markierungsbedingungen von menschlichen Lymphozyten konnte infolge Anleitung durch Frau Dr. Schendel (Institut für Immunologie der Universität München, Vorstand Prof. Dr. G. Riethmüller) (238 / 239) ausreichend Erfahrung gewonnen werden. In Lit. (192) wird behauptet, daß der Assay sehr gut reproduzierbar ist. Dies trifft sicher für Ansätze zu, die immer aus dem selben Pool schöpfen können, z.B. Zellen bestimmter Zelllinien verwenden. Im Humansystem hat sich bei den vorliegenden Untersuchungen gezeigt, daß die Zellen der einzelnen Patienten eine individuelle Empfindlichkeit auf die Kulturbedingungen aufweisen und auch die Markierungsvorgänge unterschiedlich gut verkraften. Das Maß dieser individuellen Empfindlichkeit ist in der Spannweite zwischen Maximalrelase und Spontanrelase zu sehen. In dem vorliegenden System sind zwar die Werte des einzelnen Patienten in sich gut vergleichbar, aber die Werte verschiedener Patienten sind nicht ohne weiteres aufeinander beziehbar, da das Verhältnis Spontan- zu Maximalrelase nicht für jeden Patienten im gleichen Bereich liegt.

II.5.2.4 Die Kulturdauer

In Lit. (51) wird gezeigt, daß die zytotoxische Aktivität von Mäusen, die vorher einen Tumor abgestoßen haben, nach einer Restimulation in vitro ansteigt. Kinetische Studien (82) konnten zeigen , wenn auch für MLC (mixed lymphocyte culture) Bedingungen, daß die zytotoxische Aktivität am Tag 4-6 ihre optimale Aktivität erreicht. Bisher wurde versucht, bei vorimmunisierten Tieren mit Tumorzellen nachzustimulieren (51), oder in vivo durch Infektion mit bestimmten Viren vorzustimulieren. Im Assay wurde dann die Zerstörung mit Virus infizierter Target Zellen untersucht. (72 / 149 / 99). Daneben gibt es noch eine Unzahl von Versuchen, mittels

MHC differenter Zellen eine Restimulation in vitro zu erreichen. (238)

Es ist jedoch sicher denkbar, daß das betreffende Antigen in Reinform, z.B. ein MHC Molekül, auch ausreichen würde, die Antigenrezeptoren präsensibilisierter Zellen zu besetzen und sie zur Proliferation anzuregen.

Es gibt jedoch über die Restimulation mit löslichen Antigenen, wie sie im vorliegenden System benutzt wird, kein Material. (Die Ergebnisse der Blastenstimulation mit BE sind, wie geschildert, widersprüchlich.) (s.S. 95)

Es ließ sich nur auf Grund noch unveröffentlichter Ergebnisse von Beer und Specht (19) sagen, daß im Meer-schweinsystem sich ohne Restimulation in vitro in einem ähnlichen Ansatz keine, oder nur geringe Lyse, nachweisen läßt. Nach der Restimulation jedoch sehr wohl. Es war dabei auf Grund gleichfalls durchgeführter kinetischer Studien und Kontrollen ausgeschlossen, daß es sich um ein rein in vitro generiertes Phänomen handelt.

II.5.2.5. Theorie der Zytotoxizität.

In den bisher am besten studierten Systemen der zytotoxischen Lyse bei Mäusetumoren hat sich bisher folgendes ergeben. (120)

Es konnte gezeigt werden, daß in diesen Ansätzen der lytische Prozess ausschließlich von Thymus abgeleiteten Zellen durchgeführt wird. (52 / 53)

Die T-Zell vermittelte Lyse erfordert einen intimen Kontakt zwischen der Effektorzelle und ihrer homologen Target Zelle. (231 / 280).

Wenn die Killer und die Target Zellen durch eine semi-permeable Membran getrennt sind, oder sich in einem sehr zähen Medium, wie Agarose oder Dextran, befinden, so ereignet sich keine Zytolyse. (50 / 119). Die Zytolyse ist das Ergebnis des Zusammentreffens einer Killer- mit einer Target Zelle und ist von einer vitalen Killerzelle abhängig. (27 / 117). Die T-Zell vermittelte Lyse ist wahrscheinlich unabhängig von Antikörpern, oder einem

Komplementsystem. (29 / 123). Die Effektorzelle braucht nicht zu wachsen, um Target Zellen zu lysieren und braucht auch keine DNA oder Protein zu synthetisieren. (39 / 259). Der Prozess der Lyse hat die Erkennung des Antigens zur Voraussetzung (120, S.251), d.h. der lytische Prozess kann erst einsetzen, wenn neben dem engen Kontakt der Killer- mit der Target Zelle von Seiten der Killerzelle eine Erkennung des Antigens, das die Target Zelle auf ihrer Oberfläche ausgebildet hat, abgelaufen ist. Der Bindungsprozess an die Target Zelle ist aktiver Art. Er wird durch niedrige Temperaturen, Säure und Dinitrophenol unterbunden, desgleichen durch Cytochalasin B (121), sodaß es nahe liegt, daß mikrofamentäre Strukturen eine Rolle spielen. Stulting und Berke (253), Plaut et al.(212) konnten zeigen, daß für den Bindungsprozess außerdem Magnesium nötig ist und für den lytischen Prozess Calcium. Der lytische Prozess läßt sich in drei Phasen einteilen:

- Die Interaktion von Attacker- und Target Zelle zur Antigenerkennung und Kontaktaufnahme.
- Die unmittelbaren Folgen dieser Kontaktaufnahme als Initiierung der Lyse.
- Das lytische Ergebnis in Form der Auflösung der Target Zelle.

Die Vorgänge, die sich unmittelbar an die Interaktion zwischen Attacker- und Target Zelle anschließen, sind am wenigsten bekannt. Man weiß nur, daß es eine umgekehrte Proportionalität zwischen lytischer Aktivität und dem intrazellulären cyclo-AMP level gibt.(122).

Die terminale Phase der Target Zellauflösung ist vielleicht die am besten verstandene.

Als ein Ergebnis des Zusammentreffens mit einer lytischen Effektorzelle läuft an der Target Zelle eine Reihe von Membranveränderungen ab, die mit der Ruptur derselben enden. (118). Während dieser Veränderungen ist die Anwesenheit der Killer Lymphozyten nicht mehr notwendig. (182 / 264). Die Permeabilität der Target Zelle ändert sich bereits 10min nach der Zugabe der aktivier-

ten Lymphozyten. (120). Proteingebundenes Chrom 51 oder H_3 markierte DNA werden erst nach einer längeren Zwischenzeit frei, die von der molekularen Größe des Indikators abhängig ist. Diese Befunde, die von Martz et al. (183) bestätigt wurden, ergeben, daß die initiale Läsion den raschen Austausch von kleinen Molekülen und anorganischen Ionen erlaubt, nicht aber den Austausch von Makromolekülen, an die z.B. das oben erwähnte Chrom 51 gebunden ist. Es scheint sehr plausibel, daß die letzteren erst nach weiteren sekundären Effekten auf die Target Zelle passieren können, Effekte, die auf Grund gestörter osmotischer Regulationsfähigkeit sich ergeben. Mittels extrazellulärer kolloidaler Lösungen, die das Ausfließen der hochmolekularen, intrazellulären Bestandteile verhindern, konnte berechnet werden, daß die initiale Läsion eine Größe von 90 Angström Durchmesser besitzen muß. Diese letzten Befunde sind von großer Bedeutung für den hier behandelten Test. In Lit. (192) wurde nämlich untersucht, welche Kinetik der Chromiumrelease aufweist. Die wichtigsten Ergebnisse lauten: Eine Target Zelle braucht 1-2 Stunden bei $37^{\circ}C$, um alles freisetzbare Chrom an die Umgebung abzugeben. Dies wurde von Zagury 1979 bestätigt. (285). Engers und McDonald sagen dazu (82):

" Diese Studien legen nahe, daß der Chromiumrelease, wie er routinemäßig durchgeführt wird, zu einer ständigen Unterschätzung der Zahl der Effektorzellen führt, weil das Ausmaß einer Target Zellschädigung durch beliebige Interaktion mit einer zytotoxischen Zelle über eine gegebene Zeit nie in ihrem Endpunkt gemessen werden kann. So ist dieser Test zwar in der Lage semiquantitative Aussagen über zytotoxische Prozesse zu liefern, aber niemals, exakte Aussagen über die genaue Zahl von Effektorzellen in einer lytischen Population zuzulassen. Miller und Dunkley (192) haben jedoch eine mathematische Formel ausgearbeitet, die unter bestimmten Voraussetzungen es erlaubt, experimentell eine Konstante zu bestimmen, die es zuläßt, vom Ausmaß der Lyse auf die Zahl der lysierten Zellen rückschließen zu können. In dieser Arbeit

werden noch wichtige Hinweise auf Effekte gegeben, die durch sogenannte Überbevölkerung des Testsystems entstehen. Dies ist in dem hier vorgelegten Testsystem in den beiden hohen Konzentrationsbereichen der Fall. Nach eigenen Befunden ist es im Rahmen der getesteten Parameter gleich, welche Gesamtzahl von Zellen sich in einem bestimmten Volumen verteilen, sondern, wenn das Verhältnis Attacker- Target Zellen in unserem Fall 10 : 1 überstieg, so traten sterische Behinderungen ein, die keine, oder nur noch eine minimale Lyse ermöglichten.

In letzter Zeit erschienen zwei ausgezeichnete Arbeiten, die mittels cinematographischer und elektronenoptischer Studien einen ziemlich guten Überblick aus morphologischer Sicht über die Vorgänge bei der Lyse geben.

Sanderson (234) schreibt: "Elektronische Mikrographien von Material, das während der ersten 10min eines zytotoxischen T-Zellsystems fixiert wurde, zeigte T-Zellfortsätze und ein sich Hineinwühlen von T-Zellen in Target Zellen. Die Fortsätze unterschieden sich sehr stark in Form und Größe und können sehr tief in die Target Zelle hineinreichen. Sie verbiegen Zellorganellen, die in ihrem Weg liegen, einschließlich des Kerns. Die Fortsätze enthalten feines fibrilläres Material (Vergleiche die Studien von Henney und Bubbers (121) mit der Hemmung der Lyse durch Cytochalasin B) aber keine Organellen. Die Fortsätze stoßen in die Target Zelle hinein und veranlassen diese, Taschen zu bilden, die sich der Form des angreifenden Zellfortsatzes angleichen. Es entstehen Bereiche eines engen Kontaktes zwischen den T-Zellfortsätzen und der Target Zellmembran."

Matter (185) bestätigt diese Befunde und dehnt seine Arbeit auch auf die Zeit nach den ersten 10min aus:

"Die Mikrocinematographie zeigte, daß die Target Zellyse auf dem Ein-Zell-Niveau in drei deutlich unterscheidbare Phasen eingeteilt werden kann.

- Die Erkennungsphase, bei der die Effektorzelle über die Oberfläche der Target Zelle kriecht, bis ein enger Kontakt hergestellt ist.

- Eine Phase nach der Antigenerkennung, während welcher der enge Kontakt zwischen Effektor- und Target Zelle aufrechterhalten wird, ohne daß sich an den beiden Zelltypen größere morphologische Veränderungen abspielen.
- Eine Phase der Target Zellauflösung, welche hauptsächlich durch eine starke Blasenbildung an einer bewegungslosen Schattenzelle erkennbar ist. Die Target Zelle löst sich erst nach einiger Zeit auf, um einen nekrotischen Ghost zu bilden."

Die Elektronenmikroskopie wurde dann auf Grund der Ergebnisse der Mikrocinematographie zu definierten Zeitpunkten durchgeführt. Die Phase nach der Antigenerkennung ist durch eine Apposition beider Membranen ohne Ausbildung von gap-junctions gekennzeichnet. Während des Target Zellzerfalls ereigneten sich tiefgreifende Veränderungen des Zytoplasmas und des Kerns, die sich gleichzeitig mit der oberflächlichen Blasenbildung ereignen. Am herausragendsten waren eine ausgeprägte innere Vakuolenbildung, eine Mitochondrienschwellung, eine Kernpyknose und eine Auflösung des Nukleolus."

(Ende Zitat 185).

Schon 1975 hatten Biberfeld und Johansson (31) ähnliche Befunde postuliert, worauf jedoch Henney (120) und Martz (180) entgegneten, da in Einzelfällen der lytische Prozess innerhalb von 30-60 sec beendet sein kann, sei es unwahrscheinlich, daß sich innerhalb dieser Zeit Zellfortsätze ausbilden, die die Target Zelle zerstören. Diese Diskrepanz scheint inzwischen gelöst, als Sander-son und Thomas (235) feststellten, daß es bei Target Zellen, die sich in der G1 Phase des Zellzyklus befinden, genügt, wenn sich ein Aneinanderliegen der Zellmembranen ereignet, was in diesem kurzen Zeitraum möglich ist. Die anderen Target Zellen, die sich in differenten Phasen des Zellzyklus befinden, brauchen eine längere Zeit des Kontakts und auch die Ausbildung von attackierenden Zellfortsätzen, bis sie lysiert werden können.

Als interessanter Befund zu diesem Thema wäre noch zu erwähnen, daß eine T-Zelle in der Lage ist, nacheinander mehrere Target Zellen zu lysieren, ohne dabei selber Schaden zu nehmen, oder dabei größere Leistungen, wie DNA oder RNA Synthese durchführen zu müssen. (120 / 29 / 30 / 284). Weiterhin können auch zytotoxische T-Zellen von anderen T-Zellen, die gegen sie sensibilisiert sind, lysiert werden. (101). Es scheint mir sehr bedeutsam, daß in einem System, wie dem hier vorgestellten Assay, Effektor- und Target Zelle dem gleichen Histokompatibilitätstyp angehören mußten, da es viele Hinweise darauf gibt, daß Major-Histokompatibilitätsantigene die Strukturen sind, gegen die zytotoxische Killerzellen erzeugt werden können, b.z.w. schon im Körper vorhanden sind. (5 / 84). Desgleichen soll eine Effektorzelle bei nicht MHC differenten Zellen in vivo nur dann einen lytischen Prozess einleiten können, wenn die Target Zelle neben dem Antigen auch noch das selbe MHC Antigen ausprägt. (287 / 21). Aus diesem Grunde ist es nicht möglich, im BE Zytotoxizitätsassay die in viel größerer Zahl anfallenden autologen Erythrozyten zu verwenden, da diesen die Ausprägung des MHC Komplexes fehlt.

II.5.3. DISKUSSION DER EXPERIMENTELLEN TESTERGEBNISSE

Auf Grund der mit dem BE Zytotoxizitätsassay erhaltenen Befunde kommt man zu der Vermutung, daß beim akuten Schub einer MS, Zellen im peripheren Blut nachweisbar sind, die die Potenz haben, autologe Zellen, die mit basischem Myelinscheidenprotein beschichtet sind, zu lysieren. Da es praktisch unmöglich ist, Patienten vor Ausbruch eines akuten Schubes zu bekommen, kann aus diesen Befunden nicht geschlossen werden, ob diese Zellen schon vor Ausbruch der Erkrankung vorhanden sind, oder erst nach Ausbruch der Erkrankung entstanden sind. Auf Grund anamnestischer Befragung der Patienten konnte eruiert werden, daß meist ein Abstand von etwa 14 Tagen vom Ausbrechen der ersten Symptome bis zur Blutentnahme vergangen sind. Die Angst vieler Patienten mit einer

neurologischen Symptomatik zum Arzt zu gehen, ist sehr groß. Außerdem wissen MS Patienten mit einem bereits erfolgten Schub, daß man ihnen nicht helfen kann, daß ein Krankenhausaufenthalt oft weiter nichts bedeutet, als diagnostische Quälereien, allenfalls, die Zeit bis zur spontanen Besserung mit Hilfe einiger Schwestern besser zu überstehen, als eventuell ohne Hilfe zu Hause. So ist es aus diesen Gründen nur schwer möglich, Patienten früh zu bekommen. Es war in der vorliegenden Untersuchung nur bei zwei Patienten möglich, innerhalb von zwei Tagen nach dem Beginn der Symptome Blut zu bekommen. Es wäre natürlich schön gewesen Blut- und Liquorbefunde miteinander zu vergleichen. Dies scheitert an der benötigten Zellzahl. Es sind zur Durchführung eines Minimalansatzes $1,3 \times 10^7$ Zellen erforderlich. Die Zellen müssen eine sechstägige Kulturdauer überleben, was Verluste bis zu 90% der Ausgangszellen bedeuten kann. (Die Bedingungen der BE Antigenstimulation haben hohe Verluste durch Unverträglichkeit zur Folge.).

Da im Liquor nur $2,7 \times 10^6$ Zellen pro Tag hindurchzirkulieren (69), würde es allein Tage dauern, die benötigte Zellzahl zu bekommen. Es wäre gleichzeitig mit dem Legen und Liegenlassen einer Sonde im Liquorraum mit allen Gefahren einer Infektion verbunden.

Mögliche Einwände betreffen die Patientenauswahl, die nicht ganz den Gesetzen des Zufalls gehorchen konnte und auch nur bedingt definierten Auswahlkriterien standhält. In der Anfangszeit der Studie sollten nur Patienten mit gesicherter Diagnose nach McAlpine einbezogen werden. Wie jedoch aus den Ergebnissen ersichtlich, gelang es in zwei Jahren nur vier solcher einwandfreier Patienten zu bekommen, obwohl die Studie an drei großen Kliniken Münchens durchgeführt wurde. Zum Teil erfolgte die Bekanntgabe geeigneter Patienten durch die Meldung der informierten Ärzte, zum Teil infolge eigener Besuche der Kliniken nach Diskussion des jeweiligen Falles mit den Stationsärzten. So entschloß ich mich, auch Patienten miteinzubeziehen, die mit dem Verdacht auf eine MS in

Form eines ersten Schubes in die Klinik kamen. (probable MS nach McAlpine). Hierauf wurde die Zahl der verfügbaren Patienten spürbar größer. Es war jedoch von vorneherein Sinn dieser Studie, nur Pilotstudie zu sein, die herausfinden wollte, ob sich überhaupt Hinweise auf Autoimmunphänomene gegen BE bei der MS finden lassen. Trotz aller Schwächen bezüglich Patientenauswahl hat es diese Versuchsserie doch fertigebracht zu zeigen, daß ein Zusammenhang zwischen BE und MS besteht. Um den geschilderten Test als diagnostisches Kriterium verwenden zu können und daraus weiter Schlüsse zu ziehen, ist es jetzt notwendig, eine Studie anzuschließen, in der Patienten mit Verdacht auf MS und auch mit gesicherter MS einer langfristigen Nachsorge mit diesem Test unterworfen werden. Außerdem müßten alle Patienten, die mit einer Beziehung zur MS ins Krankenhaus aufgenommen werden, diesen Test durchlaufen. Dazu ist es erforderlich, die Klinik auf eine einheitliche Basis zu stellen. Es sollten im Gegensatz zur vorliegenden Studie auf alle Patienten die gleichen Kriterien angewendet werden, was Diagnosestellung und Evaluation der Symptome angeht. (Jede der beteiligten Kliniken hatte eine etwas andere Art der Diagnosestellung.) Es müssen alle Patienten einer Punkteskala unterworfen werden, um feste Kriterien zu haben. Die Fog Skala ist dafür nicht unbedingt geeignet. Auf Grund ihrer einfachen Handhabung und schnellen Durchführbarkeit stellte sie zwar hier einen idealen Kompromiß dar, aber es fehlen doch einige wichtige Kriterien, wie imperativer Harndrang, Gesichtsfelddefekte werden nicht ausreichend erfaßt, und evoked potentials, nach Meinung einiger Autoren wichtige Maßstäbe der Diagnosestellung, nicht berücksichtigt. Bei der Diagnosestellung sollten wichtige Ergebnisse bisheriger Forschungsarbeiten, wie Bestimmung des IgG Gehalts im Liquor, oder spezifische Banden in der Liquorimmunelektrophorese, daneben Computertomogramm und ähnliche Methoden Eingang finden. Wichtig ist auch, genau festzulegen, ob und wann sich ein Patient im Schub befindet

und wann in der Remission. Die sehr einheitlichen Ergebnisse aus der vorliegenden Studie müßten durch Verlaufsuntersuchungen am selben Patienten ergänzt werden. Die Differenzierung von MS zu anderen neurologischen Erkrankungen, wie z.B. Hirninfarkten, Tumoren usw. mit diesem Test muß noch weiter überprüft werden.

Nun zum Test als solchen. Die technischen Voraussetzungen und die Literatur dazu wurden bereits ausführlich erörtert. Es ist noch folgendes hinzuzufügen. Aus Tierversuchen mit der EAE (19) ist aus einem ähnlichen Testsystem bekannt, daß die Durchführung des Tests sofort am Tag der Blutentnahme kaum oder nur spärliche Ergebnisse bringt. Es ist unbedingt erforderlich, die Target Zellen in Blasten überzuführen, was zwei bis drei Tage in Anspruch nimmt. Aus anderen Studien ist bekannt, daß man bei in vitro Nachstimulation zytotoxischer Systeme mit Antigenen optimale Ergebnisse nach 5 - 6 Tagen erreicht, und daß die erreichbare Lyse dann erheblich höher ausfällt als ohne Stimulation. Man muß sich also das Testsystem als einen Verstärker vorstellen, der kleine Impulse gut verstärkt, der aber auch mit übersteigter Empfindlichkeit nicht verstärken kann, wo nichts da ist. Dies zeigen ganz deutlich die Ergebnisse bei Normalpersonen, wo in keinem Fall beim Assay gegen BE eine Lyse nachzuweisen war. Im Patientensystem wird aber die sicher nicht enorm große Anzahl der sensitivierten Zellen durch den Kultivierungs- und Testprozeß verstärkt und so sichtbar gemacht. Es wurde auf die Testung eines anderen Antigens im Test verzichtet. Es wäre z.B. möglich gewesen, eine Target Zellpopulation mit Ovalbumin zu beschichten und im Ansatz laufen zu lassen. Es war jedoch zum Teil schwierig genug, ausreichend Zellen für die als absolut notwendig erachteten Ansätze zu erhalten. So lebt diese Studie mit dem Manko, keine positive Kontrolle im Testansatz zu beinhalten.

sondern nur die negative. (nur mit Chrom markierte, unbeschichtete Zelle). Es erschien jedoch nicht angebracht Menschen mit Ovalbumin zu immunisieren, um nachweisen zu können, daß das angegebene Versuchssystem auch bei Ovalbumin eine zellulär vermittelte Lyse demonstrieren kann. Es bleibt nur noch die Frage zu klären, welche der vorhandenen Subpopulationen für die Lyse verantwortlich ist. Der Ficollgradient liefert nach Boyum (32) ca. 80% Lymphozyten und 20% Makrophagen für die Kultur. Durch eigene Untersuchungen wurde gezeigt, daß der Anteil der Makrophagen, der an den Plastikwänden der Kulturflaschen hängenbleibt 5% nicht übersteigt. Da nach einigen Tagen die Vitalität der Zellen um 70% beträgt und aus der Gesamtzahl Verluste von 70-80% zu melden sind, ist das Kultursystem ein sehr selektiver Ausleseprozess, den wir mit morphologischen Gesichtspunkten allein nicht verfolgen konnten. Es konnte also nicht festgestellt werden, welcher Prozentsatz von Makrophagen oder Lymphozyten durch die Kultur mehr zugrundegeht, b.z.w. welche Population selektiver betroffen ist. Es bleiben jedoch immer die folgenden theoretischen Möglichkeiten bestehen:

- für die Lyse zeichnen allein Lymphozyten verantwortlich (zytotoxische Lyse nach 195 und 234).
- für Lyse sind nur Makrophagen verantwortlich, wie von Brosnan et al. (36) demonstriert, die zeigen konnten, daß aktivierte Makrophagen bei Lewis Ratten proteolytische Faktoren sezernieren, die BE abbauen können.
- die schon bei der Morphologie der MS vorgeschlagene Lösung, daß Lymphozyten Faktoren sezernieren, die Makrophagen zum Zerstören des Myelins aktivieren.

Unsere Assaybedingungen machen es zwar unwahrscheinlich, daß die Sekretion letzterer Faktoren während der vier Stunden Inkubation geschieht, (das Medium wird durch die Waschungen beseitigt), jedoch hat die Aktivierung der Makrophagen sicher schon in der Kultur stattgefunden. Es ist keineswegs bekannt, ob die beschriebenen

Faktoren, wie macrophage inhibiting factor (MIF) permanent vorhanden sein müssen, um in den abhängigen Zellen eine bestimmte Funktion auszulösen, oder ob die kurze Zeit reicht, die faktorenabhängigen Zellen zu aktivieren und nur nach einiger Zeit, z.B. durch eine fortdauernde Antigenpräsentation, eine erneute Ausschüttung als Nachstimulation erforderlich ist. Es liegen aus dem BE Zytotoxizitätssystem keine Faktoren darüber vor, welche Möglichkeit zutrifft. Die Alternative der faktoreninduzierten Lyse stellt jedoch die ideale Lösung dar, weil sie es auch erlaubt, die Diskrepanz zum morphologischen Bild der MS zu erklären, wo Lymphozyten und Plasmazellen auf den perivaskulären Raum beschränkt sind. Ein interessanter Befund würde auch eine Brücke zu den vielen Forschern schlagen, die die MS für eine slow virus Erkrankung halten, wie z.B. Ter Meulen (258). McDermott et al. (187) haben mit dem macrophage electric mobility Test nach Caspary und Field (48) festgestellt, daß menschliches BE mit Masern Virusantigen kreuzreagiert, denn die Filtration von gegen BE sensibilisierten Zellen über eine mit Masernantigen beschichtete Biorad-Säule beseitigte die gegen BE gerichtete Aktivität aus der Zellpopulation und dieser Vorgang konnte durch Vorinkubation mittels Masernantikörpern geblockt werden. Mit all den Befunden zusammengekommen wäre es jetzt möglich eine Theorie der MS aufzustellen.

Es erfolgt die Infektion eines Individuums mit Masernvirus. Das Immunsystem ist nicht in der Lage, (genetischer Defekt ?), den Virus komplett zu eliminieren, sodaß er in Form einer slow virus Infektion weiterhin aktiv bleibt. Das Immunsystem ist jedoch nicht untätig. Es sensibilisiert sich gegen die Determinanten des Virus, die wie gerade gezeigt, mit menschlichem BE kreuzreagieren. In einem ersten Schub erfolgt ein Angriff auf das BE des Gehirns, das das Virusantigen imitiert. Vielleicht müssen zur Ausbildung einer Läsion noch die anderen Determinanten des Virus dazukommen, um die Entzündung und Plaquebildung zu triggern. Es wird jedenfalls

BE in größerer Menge frei und dem Immunsystem zugänglich. Dies gibt dem Immunsystem Gelegenheit zum ersten Mal auch mit anderen Determinanten des BE in Verbindung zu kommen, die zum Teil Eigenschaften zeigen, die den Ausbruch der Erkrankung supprimieren können. (209).

Gute Hinweise liefert auch die Arbeit von Huddlestone et al. (130), die zeigen konnten, daß mit den MS Schüben Schwankungen der Suppressorzellpopulation verbunden sind. Die einmal ausgelöste Immunantwort folgt nun ihren eigenen Regeln, deren Komplexität Tourtelotte et al. in Lit. 17 auf S.112 eindrucksvoll demonstrierte.

Der Beweis dieser Theorie und das Zutreffen der Befunde dieser Studie wären nicht nur Grundlagenforschung, sondern hätten auch eindeutige Konsequenzen in Bezug auf eine Therapie, die bisher auf so radikale Maßnahmen, wie eine totale Immunsuppression durch ALG, Cortison und / oder Azathioprim, oder auf Stoffe kaum bekannter Wirkungsweise, wie ungesättigte Fettsäuren, angewiesen ist und doch nur wenig Erfolge hat. Es gäbe grundsätzlich die Möglichkeit, die suppressiven Populationen des Immunsystems zu stärken, oder die aggressiven zu hemmen.

Die erstere Möglichkeit könnte in einer Injektion der spezifischen antigenen Determinanten des BE bestehen, die vor dem Ausbruch der Erkrankung schützen.(262).

Die andere Möglichkeit wäre, aus einem Kultursystem, wie dem hier vorgestellten, die aggressiven Zellen zu extrahieren und dann zu klonieren, um dann Antikörper, eventuell in monoklonaler Form, dagegen herzustellen. Weiter wäre es möglich, sollte sich eine Interaktion von aggressiven Zellen über lösliche Mediatoren als Ursache herausstellen, gegen diese Mediatoren Antikörper, oder Stoffe, die deren Wirkung blockieren, einzusetzen.

Es eröffnet sich somit ein breites Feld von Therapiemöglichkeiten, von denen man hoffentlich in naher Zukunft sagen kann, welche davon zutreffend und Erfolg bringend ist.

III. LITERATURÜBERSICHT

Es folgt nun ein ausführlicher Literaturteil, der sich mit den bisher bekannten immunologischen Vorgängen bei der MS befaßt.

Dies ist wichtig, um die Bedeutung des hier vorgestellten Testes im Zusammenhang mit der bisherigen MS Forschung verstehen zu können.

III. 1. DIE TIERMODELLE DER MULTIPLEN SKLEROSE

III.1.1. DIE AKUTE EAE:

Sie stellt eine experimentelle Autoimmunerkrankung dar, die in vielen Labortieren erzeugbar ist. Sie kann willkürlich in empfindlichen Tieren durch eine einzige Injektion von einem Homogenat zentralnervösen Gewebes oder gereinigtem basischem Protein (BE) ausgelöst werden. Als Emulgator muß komplettes Freund'sches Adju-

vans verwendet werden. (69)

Die Erzeugung der Krankheit unter diesen Bedingungen ist mit gleichbleibendem Resultat beständig reproduzierbar. Die experimentelle Erkrankung der akuten EAE ist mit folgenden klinischen Manifestationen verbunden: Lähmung der hinteren Extremitäten, abnorme Salivation, Inkontinenz und eventuell Tod. Histologisch sind entzündliche Läsionen in Gehirn und Rückenmark nachweisbar, die sich gewöhnlich zwei oder drei Wochen nach Injektion einstellen. Der autoimmune Charakter der Erkrankung wurde durch verschiedene Kriterien bewiesen, hauptsächlich durch die Möglichkeit, sie durch einen direkten passiven Transfer von sensibilisierten Lymphozyten zu erzeugen. Es scheint, daß die Krankheit primär mit Zellen vom Typ einer delayed type hypersensitivity (DTH) und nicht mit zirkulierenden Antikörpern verbunden ist. (208). Eng et al. (79) konnten 1968 zeigen, daß für die Krankheitsauslösung in den Tieren ein ganz bestimmter Bestandteil zentralnervösen Gewebes verantwortlich ist, welcher encephalitogenes Agens genannt wird. Es handelt sich dabei um ein niedermolekulares basisches Protein, welches BE, für basisches Encephalitogen genannt wird. Seine Sequenz wurde von Eylar 1970 (85) und Carnegie 1971 (42) vorgelegt und von Eylar et al. 1971/ Chao und Einstein 1970 und Kibler et al. 1972 (Lit. in 69) die Regionen auf dem BE gefunden, die für die encephalitogene Aktivität in verschiedenen Tierspezies verantwortlich sind. Diese Regionen bekannter Sequenz nennt man encephalitogene Determinanten. Auf dem basischen Protein findet sich eine Aminosäurenabfolge, die das einzige in dem gesamten BE Molekül enthaltene Tryptophan enthält. Diese Determinante ist für die Erzeugung der EAE im Meerschweinchen erforderlich. Eine chemische Veränderung dieses Tryptophans oder eine enzymatische Entfernung der Determinante aus dem BE führt zu einem totalen Verlust der krankmachenden encephalitogenen Aktivität. Entfernt man jedoch die übrigen Aminosäuren des BE's bis auf wenige Moleküle um das Tryptophan

herum, so bleibt diesem Restpeptid (Nonapeptid genannt) die krankheitsauslösende Potenz erhalten.

Im Gegensatz zu den Befunden am Meerschwein ist bei Affen die Tryptophan enthaltende Sequenz nicht erforderlich. Hier ist die hauptencephalitogene Determinante die C-terminale Region des BE's.

Morphologisch ergibt sich folgender Ablauf bei der EAE: Es findet eine perivenöse Anhäufung von Zellen statt, die ihren Ursprung im Blut haben. Das umgebende Parenchym wird von Zellen aus diesem sog. perivenösen Cuff infiltriert und es erfolgt eine vesikuläre Auflösung und Durchdringung der Myelinlamellen durch diese hämatogenen Zellen. Anschließend wird die Myelinscheide phagozytiert (69, S. 136)

Man hatte daraufhin viel über immunologische Phänomene bei dieser Erkrankung geforscht. Hier sollen nur einige wichtige Ergebnisse dargestellt werden.

Es scheint sich um eine Autoimmunerkrankung zu handeln, die an die Anwesenheit von T-Lymphozyten gebunden ist, welche eine Determinante des basischen Myelinscheidenproteins als Antigen erkennen. (18) Die Erkrankung konnte durch einen Transfer der Zellen der T-Zellreihe von kranken auf gesunde Tiere übertragen werden, was mit Serumbestandteilen nicht gelang. (141, 207, 210, 211, 251, 275). Eine Arbeit existiert jedoch, bei der die Übertragung auch mit Überständen kultivierter präsensibilisierter T-Zellen gelang. (273, 274)

Man kann bei immunisierten Tieren eine DTH gegen BE nachweisen. Diese bleibt jedoch bei alleiniger Immunisierung mit der encephalitogenen Determinante aus, sodaß die verschiedenen Sequenzen des BE unterschiedliche Immunantworten auslösen müssen. (113, 114)

Die Erkrankung ist an bestimmte MHC Antigene gekoppelt, wie durch die verschiedene Empfindlichkeit einzelner Stämme der gleichen Tierspezies und ihrer hybriden Nachkommenschaft gezeigt werden konnte. (23)

Man hat bei Meerschweinchen vom Stamm 13 (für die Erzeugung von EAE sensible Stämme) und vom Stamm 2 (gegen die Erzeugung von EAE resistente Stämme) das

Knochenmark zerstört und jeweils durch das Knochenmark des anderen Stammes ersetzt. (Die beiden Stämme unterscheiden sich nur in einem MHC Antigen.)

Bei diesen Tieren (Körper Stamm 13 / Knochenmark Stamm 2) und (Körper Stamm 2 / Knochenmark Stamm 13) wurde nun getestet, in welchem Ausmaß sie sensibel auf die Erzeugung einer EAE waren. Da bei den Meerschweinchen (Körper Stamm 2 / Knochenmark Stamm 13) EAE erzeugt werden konnte, obwohl Stamm 2 Meerschweinchen eigentlich EAE resistent sind, bei den anderen jedoch nicht, obwohl sie eigentlich EAE sensibel sein müßten, zog man den Schluß, daß die Kontrolle über den Ausbruch einer EAE von der genetischen Herkunft des lymphohämatopoetischen Systems abhängig ist und nicht von der genetischen Ausstattung des Nervensystems. (23)

Für Lymphknoten und Milzzellen immunisierter Tiere ließen sich in vitro Stimulationen durch BE bis zum Index 10, sowie auch durch das encephalitogene Nonapeptid erreichen. (23) Außerdem wurde gezeigt, daß sich in der Kultur Makrophagen befinden müssen, da sonst keine Stimulation möglich ist. (23)

Außerdem korreliert der Prozentsatz der mit Schafserythrozyten Rosetten bildenden Zellen im Blut der Tiere mit ihrem Krankheitsstadium. Bei der akuten EAE soll ein starker Anstieg der T-Zellen vor dem Manifestwerden der Klinik stattfinden. Danach sollen diese Zellen stark absinken. (261)

Bei der chronischen EAE wurde ebenfalls eine ähnliche Fluktuation der T-Zellen gezeigt, jedoch ohne einen deutlichen Anstieg vor dem Ausbruch der Klinik, sondern nur ein deutlicher Abfall der Lymphozyten während des Schubs. (157) Ansonsten sind die immunologischen Befunde bei der chronischen EAE noch recht spärlich, da konsequenterweise bisher erst der genaue morphologische Ablauf erforscht werden mußte, den man in der nachfolgenden Tabelle über die chronische EAE nachvollziehen kann.

TABELLE I. :

Die akute EAE

Erzeugung:	Injektion von BE oder Nonapeptid in komplettem Freund'schem Adjuvans. (CFA)
------------	--

Folge der	Immunisierung: akute Erkrankung der Tiere 14-18 Tage post immunisationem
-----------	---

Verlauf:	monophasischer Verlauf: Tod 1-3 Tage nach Einsetzen der Klinik.
----------	--

Klinik:	abnorme Salivation, Inkontinenz, Paraplegie, Tod
---------	---

Histologie:	Hauptläsionen im tiefen Marklager beider Hemisphären und des Kleinhirns; Ependymitis, welche auf die Temporalhörner beschränkt ist; Läsionen auch in subpialen Gebieten des Rückenmarks; Infiltration der Leptomeningen mit Lymphozy- ten und Makrophagen; ab und zu eine Plasma- zelle; verstreute nicht konfluierende Ent- zündungsherde mit konfluierenden Arachnoidea- läsionen; Demyelinisierung;
-------------	--

Elektronenmikroskopie:	entzündliche Reaktion der Meningen und um die Blutgefäße; Demyelinisierungsherde: klein, fast auf den subpialen Raum beschränkt; Nebeneinanderbestehen von a, aktivem Abschälen der Myelinscheide durch mononukleäre Zellen b, Reduktion des Myelins auf ein Netzwerk, das durch benachbarte Makrophagen aufge- nommen wird
------------------------	--

Besonderheiten: An den Nervenwurzeln, wo zentrales und peripheres Myelin ineinander übergehen, findet eine scharfe Demarkierung der Demyelinisierung statt. Zentrales Myelin ist zerstört, peripheres nicht. Blutzellen können über Spalten zwischen dem Endothel und dem Virchow-Robin'schen Raum in das Parenchym eindringen. (219) Gewundene Zytoplasmafortsätze von Makrophagen trennen die Myelinlamellen voneinander.

III.1.2. DIE CHRONISCHE EAE

Tabelle II:

Morphologie der chronischen EAE

Erzeugung: Injektion von isologem ZNS Homogenat in CFA in jugendliche Tiere (252)

Folge der Immunisierung: verzögert einsetzender Beginn der Erkrankung 8-21 Wochen post immunisatio.

Verlauf: polyphasischer Verlauf mit 1-3 spontanen Rückfällen

Klinik: Gewichtsverlust
Inkontinenz
abnorme Salivation
Paraparese
(Dauer der Neurologie 2-4 Wochen, dann Rückbildung mit Defekten)

Histologie: Hauptveränderungen im Rückenmark, besonders in den Vorderhörnern;
Entzündungen auch in den Meningen und im Parenchym;
Demyelinisierungsherde: plaqueartig, scharf begrenzt; perivaskuläre Infiltrate fast völlig aus Makrophagen bestehend, mit vereinzelt Plasmazellen und Lymphozyten;

Meningen entzündlich infiltriert;
Proliferation der Adventitia der Blutgefäße

Elektronenmikroskopie:

Meningen überfüllt mit Entzündungszellen
und Kollagenfibrillen;
Es kommt fast nur der Typ a, aktives
Abschälen des Myelins vor; Netzwerkauflö-
sung nicht beobachtet;
Nebeneinanderbestehen akuter und
chronischer Entzündung;
chronisch demyelinisierte Plaques zeigen
starke Gliose mit großen Myelinfragmenten
in Makrophagen der Läsionsperipherie;
Anwesenheit von Oligodendroglia;
Die Blutgefäße in der Mitte der chronisch
demyelinisierten Gebiete zeigen einen stark
vergrößerten Virchow-Robin Raum mit Zellen
inmitten eines Haufen von Kollagenablage-
rungen;

Die beiden vorhergehenden Tabellen wurden auf Grund von
Angaben in folgenden Arbeiten erstellt:
(69, S.133-137/ 159 / 218 / 219 / 262)

III. 2. DIE MORPHOLOGIE DER MULTIPLN SKLEROSE

Die bisher durchgeführten Studien unterscheiden in ihren
Aussagen zwischen früher und später Läsion, wobei nur
die frühe Läsion für die Grundlagen des vorgestellten
Testes von Bedeutung ist.

Es handelt sich dabei um die Beschreibung einer morpho-
logischen Veränderung im ZNS, wobei man auf Grund
anamnestisch klinischer Parameter darauf schließt,
daß sie erst kürzlich

entstanden sein muß. (214)

Dabei ist der Begriff kürzlich keineswegs genau definiert. Meist handelt es sich dabei um Fälle, die kurz vor ihrem Tode noch eine Exazerbation ihrer Krankheit erlebten, die man mit der Bezeichnung Schub belegen konnte. Es handelt sich bei den bisherigen Studien um Zeiträume von drei bis fünf Wochen nach Ausbruch der Symptome, bis dann die morphologische Untersuchung stattfand. (214).

McAlpine (186) beschreibt, daß die höchste Intensität einer klinischen Exacerbation bei 40% der Patienten innerhalb von Stunden erreicht ist und in 70% in weniger als einer Woche. Prineas (214) zieht daraus den Schluß: " Dies bedeutet möglicherweise, daß die Mehrheit dieser sogenannten kürzlich noch aktiv gewesenen Läsionen in Wirklichkeit inaktiv sind, und daß die Veränderungen, die man in solchen Läsionen beobachtet, vollständig reparativer oder reaktiver Natur sind. "

Trotzdem soll zusammengefaßt werden, was die bisherigen Studien dazu ergaben.

Als älteste Arbeit ist die Dawson Studie von 1916 zu nennen. (70). Sie wird von vielen auch heute noch als eine der besten Studien betrachtet, weil sie angeblich die Fälle beinhaltet, bei denen der Abstand vom Auftreten der Klinik und Untersuchung am geringsten ist. (Vier solcher Fälle sind enthalten) (214, S.532).

Der Plaque wird in mehrere morphologische Einheiten unterteilt:

1. der Perivenöse Raum:

" Es handelt sich bei den Plaques um perivenöse Gebiete, die frei von Myelin waren, aber angefüllt mit Zellen, die Fettgranula enthielten. Es gab keinen Anhalt für eine fibröse Gliose. Die in den Plaques gelegenen Gefäße erschienen erweitert und in 75% der Fälle war der adventitielle Raum um die Gefäße mit Zellen ausgedehnt, welche Fettgranula enthielten, oder sowohl diese Zellen als auch Lymphozyten." (70/214)

2. die demyelinisierte Zone:

" Zusätzlich zu den mit Fett beladenen Zellen fanden sich in der demyelinisierten Zone Gliazellen mit großen vesikulären Kernen und langen, sich aufzweigenden Fortsätzen, sowie zahlreiche kleine Zellen mit einem stark färbbaren Kern, ohne Fortsätze und mit wenig Zytoplasma." (70/214)

3. die Randzone:

" Die Ränder der demyelinisierten Zone erschienen hyperzellulär (3 / 98 / 137) und diese vermehrte Zelldichte zog sich auch in die normale weiße Substanz hinaus. Die Zellen in diesem Gebiet sind Zellen mit kleinem Kern. Darüberhinaus kommen fettbeladene Zellen und vergrößerte protoplasmatische Gliazellen vor. In dieser Randzone werden gleichzeitig Myelinveränderungen festgestellt, welche sich als Abblassung des Myelins und Schwellung der Myelinscheiden äußern." (70 / 214)

An Plaques, die offenbar im Begriff waren sich zu vergrößern, wurde ein verändertes Aussehen des Myelins und die Anwesenheit der oben beschriebenen Zellen mit dunklem Kern gesehen. Zimmermann und Netsky, Greenfield und Norman sowie Lumsden (105 / 172 / 286) fügten hinzu, daß auch in Abwesenheit einer vergrößerten Anzahl lokaler Zellen ein Myelinzusammenbruch feststellbar war, wobei das Myelin sich nur schwach anfärben ließ und allgemein oder auch unregelmäßig geschwollene Myelinscheiden feststellbar waren. Guseo und Jellinger (107) stellten dazu eine statistische Untersuchung an und fanden in 84% der Fälle eine aktive Demyelinisierung, die von einer mäßigen bis schweren Infiltration begleitet war. In zwei von 19 Fällen wurde jedoch die Gesetzmäßigkeit durchbrochen, daß eine Demyelinisierung auch von einer Zellinfiltration begleitet sein muß. Einer dieser Fälle zeigte eine schwere Demyelinisation ohne Zellinfiltration und der andere zeigte eine schwere Zellinfiltration , jedoch keine Demyelinisierung.

In einer Einzeldiskussion der Punkte ergibt sich:
Morphologisch handelt es sich bei den Plaques um Gebiete, bei denen sich um Gefäße, deren Wände von nicht immer exakt zuordenbaren Zellen infiltriert sind, Regionen anschließen, die frei von Myelin sind. Die Myelindichte nimmt gegen den Rand hin wieder zu. Gleichzeitig treten von außen Zellen an den Plaque heran, die einen dichten Ring um den Plaque bilden, ebenfalls nur teilweise charakterisierbar sind, die sich jedoch auch in offensichtlich noch normale weiße Substanz fortsetzen. Die demyelinisierte Zone im Inneren des Plaques ist ebenfalls leicht von Zellen durchsetzt, von denen nicht ganz klar ist, ob sie sich aus dem perivenösen Cuff, oder aus der hyperzellulären Randzone ableiten. Als gemeinsames, wenn nicht gar als konstantes Phänomen, wird allgemein akzeptiert, daß innerhalb der demyelinisierten Zone ein bißchen Cuffing der Gefäße durch chronische Entzündungszellen als ein typisches Charakteristikum anzusehen ist. Es wurde festgestellt, daß die Entzündungsmanschetten (Cuffs), die vornehmlich aus Makrophagen, die Fett speicherten, bestehen, mit zunehmendem Myelinverlust auch an Umfang zunehmen. (2). Adams und al. (69) haben 1971 dazu folgendes geäußert. Sie haben bei vier Fällen, die innerhalb weniger Tage infolge Befalls von Mittelhirnzentren starben, die gleichzeitige Anwesenheit mehrerer Typen perivenöser Cuffs festgestellt. (69, S. 92)

- " Es gab Cuffs, die vornehmlich aus Makrophagen oder Histiozyten mit wenigen beigemischten Lymphozyten bestanden. Diese fanden sich meist direkt an den Plaque angrenzend.
 - Dann gab es Cuffs aus vornehmlich Lymphozyten und einigen Plasmazellen. Sie fanden sich sowohl sehr nahe zum, als auch in einiger Entfernung zum nächsten Plaque. Diese wurden als Vorläufer späterer kleiner demyelinisierender Plaques angesehen."
- Lumsden (172) lieferte dazu unterstützende Befunde.

" Dann gab es noch Varianten der genannten Cuffs mit:

- a, ein kleiner Rand von Myelinabblassung wird um die Cuffs gefunden. Die Fläche der Myelinabblassung ist proportional dem fehlenden Lipidgehalt darin, sodaß sich noch nicht der Schluß ziehen läßt, daß dem Myelinuntergang ein selektiver Abbau des Gerüstproteins (BE) der Myelinscheide vorausgeht.
- b, umgebende Neuroglia enthält Lipideinschlüsse, welche als Cholesterin, Sulfatide und einige Cerebroside identifiziert wurden.
- c, gab es noch Cuffs, die ein paar pigmentierte Zellen enthielten. Das Pigment dürfte nach einigen chemischen Untersuchungen oxydiertes Lipofuscin sein."(69)

Nachzutragen wäre noch, daß in einem Drittel der akuten Fälle keine Lymphozyten im Plaque gefunden wurden. (1). Als gravierender Unterschied zu den beiden Tiermodellen ist herauszuheben, daß es bei der MS folgendes Phänomen nicht zu geben scheint. Bei der EAE finden sich nämlich in Myelinphagozyten oft große, gut erkennbare Myelinbruchstücke (219), die oft ein hervorstechenderes Merkmal darstellen, als die auch vorhandenen Lipidtröpfchen. In der frühen MS Läsion scheint jedoch eher folgendes Bild vorherrschend zu sein. In Phagozyten findet sich eine Ansammlung von Tröpfchen, vor allem Neutralfetts, während sich erkennbarer Myelinschutt praktisch nicht nachweisen läßt. Auch das bekannte Bild der Makrophagen, die mit ihren Fortsätzen ganze Myelinlamellen abheben (69, Fig. 8-5, Lampert 1973)(158), ließ sich bisher bei der MS nicht finden. Man könnte dies jedoch mit dem größeren Abstand zwischen Entstehung und Untersuchung der Phänomene bei den Patienten erklären, da eine so engmaschige morphologische Verfolgung wie im Tier nicht möglich ist.

1968 erschien noch eine ausgezeichnete elektronenoptische Studie von Lampert (157).

Er teilt die frühe MS Läsion in mehrere Zonen ein:

- A, "angrenzende normale weiße Substanz"
- B, "Zone vermehrter Zelldichte"

C, " Zone plötzlich reduzierter Myelindichte "

D, " die demyelinisierte Zone "

E, " die perivaskulären Räume "

(Die Reihenfolge der Buchstaben entspricht dem Aufbau des Plaques, von außen nach innen vorgehend.)

zu A, " Die angrenzende weiße Substanz. "

"Es konnten keine Feinstrukturunterschiede zwischen MS Patienten und Patienten mit anderen neurologischen Erkrankungen festgestellt werden."

zu B, " Die hyperzelluläre normal myelinisierte Zone. "

" In dieser relativ breiten Zone erscheint das Myelin normal dicht oder nur leicht reduziert. Die Gefäße zeigen ein schwaches oder mäßiges Cuffing. Der Unterschied zu entferntem Gewebe war jedoch nur mit Mühe feststellbar. Im Vergleich zu normaler weißer Substanz enthielt diese Zone einen erhöhten Anteil von Zellen mit kleinem, dunklem, unregelmäßig kontouriertem oder ausgezipfeltem Kern. Diese Zellen enthielten oft zytoplasmatische Einschlüsse, welche sich deutlich von den Lipo-fuscingranula der Astrozyten unterschieden. Ansonsten war das Gewebe völlig normal. Vor allem die zahlreich vorhandenen Oligodendrozyten zeigten keine Anzeichen für eine gliöse Veränderung. Sie waren völlig normal. Es waren keine kleinen oder transformierten Lymphozyten vorhanden. "

zu C, " Zone plötzlicher Verringerung der Myelindichte."

"Diese Zone ist gewöhnlich viel schmaler als die eben beschriebenen und das einzig Auffallende ist, daß, neben der stark verringerten Myelindichte, die meisten der Einschlüsse tragenden Zellen auch zahlreiche kleine Fettröpfchen enthielten. Es gab auch hier offensichtlich nur unbeschädigte Oligodendrozyten. "

zu D, " Zone der Demyelinisierung. "

" Alle Axone dieser Zone waren völlig demyelinisiert. Es waren viele Fetteinschlüsse enthaltende

Zellen vorhanden, aber wenig oder kaum Myelindebris. Man konnte gelegentlich nekrotische Zellen und Plasmazellen sehen."

zu E, "Der perivaskuläre Raum (Virchow-Robin space)"

"Die vielen Einschlüsse tragenden Zellen versammelten sich alle ziemlich dicht an der äußeren Basalmembran. Gelegentlich konnte man Einschlußmaterial frei im Virchow-Robin Raum liegen sehen und auch Makrophagen mit ungewöhnlich großen zytoplasmadichten Körpern."

(157 / 214)

Auch diese Studie war nicht in der Lage, die Natur und Herkunft der Einschlüsse tragenden Zellen zu klären. Und es konnte auch nicht ermittelt werden, in welcher Form die Zellen des perivaskulären Raumes an dem Myelinabbau beteiligt sind, wenngleich gezeigt werden konnte, daß sich Lymphozyten im perivaskulären Raum ansammeln. Da sich dort auch Makrophagen aus dem Blut in größerer Zahl aufhalten, wurde vermutet, daß die lokalen Zellen des ZNS allein nicht in der Lage sind, den Myelinabbau vollständig durchzuführen. (216, S.417)

Adams (69,S.94) zieht bezüglich der frühen Läsion folgendes Resumé: "Wir stimmen mit dem Großteil früherer Untersucher darin überein, daß das lymphozytäre Cuffing der Gefäße ein früher Vorgang ist, der der Demyelinisierung vorangeht, wenngleich sich in einem Drittel der akuten Fälle im Plaque selber keine Lymphozyten finden." (auch in 1 bestätigt)

II.2.2.

Zusammenfassung der Morphologie der MS:

Will man jetzt aus der Morphologie Schlüsse auf das Geschehen ziehen, so scheint sich bisher trotz aller Differenzen und Schwierigkeiten in der Evaluation der Morphologie folgendes Bild abzuzeichnen.

Adams (69, S. 94) und andere Untersucher sind sich darüber einig, daß zuerst ein perivenöses Cuffing der Gefäße auftritt, das fast rein lymphozytär ist. Es ist nun nicht mit Sicherheit nachzuweisen, ob diese Lymphozyten den perivaskulären Raum verlassen, da sich in einer anderen Studie von Adams zeigte, daß sich in 1/3 der akuten Fälle keine Lymphozyten im Plaque nachweisen lassen.(1). Zeitlich nach der lymphozytären Infiltration der perivenösen Gefäßräume soll im umgebenden Parenchym die Demyelinisierung stattfinden. Dieser Vorgang geht mit der perivenösen Anwesenheit von Makrophagen einher (in den Virchow-Robin Räumen), aber auch im Parenchym, wenngleich dort in geringerer Anzahl.

Im Plaque selber befinden sich noch mit Fettröpfchen beladene Zellen, die nicht genau einer bestimmten Zellsorte zugeordnet werden können. Im Laufe der Chronifizierung der Erkrankung und reparativer Vorgänge erfolgt eine narbige Umwandlung des Gewebes in Form einer Sklerosierung. Remyelinisierungsvorgänge, wie sie bei der EAE beschrieben worden sind, sind mir bei der MS nicht bekannt. (80).Einen Ausweg aus dem morphologischen Dilemma,daß sich keine Lymphozyten im Plaque nachweisen lassen, bietet eine Arbeit über EAE, welche zeigen konnte, daß auch Überstände kultivierter,sensibilisierter Lymphozyten eine Demyelinisierung auslösen können. (274)

Eine Zusammenfassung der bisher belegbaren Vorstellungen über Möglichkeiten einer Demyelinisierung findet sich in einer Arbeit aus den Acta neuropathologica. (159). Bei der MS ist die perivenöse Anwesenheit mononukleärer Zellen ein guter Hinweis auf eine aktive oder progrediente Läsion. (107). Invasion von Lymphozyten und Plasmazellen ins Parenchym ist jedoch kein Bestandteil

der frühen Läsion der MS. (214). Eine Tatsache, die zu der Hypothese führte, daß die Demyelinisierung bei der MS durch humorale Faktoren wie Antikörper, oder durch toxische Substanzen, oder durch ein Ödem induziert wird. Bei der chronischen EAE ist ein ähnliches Bild zu beobachten. Lymphozyten und Plasmazellen bleiben auf den perivenösen Raum beschränkt, was die aktive Läsion anbetrifft. Die entzündliche Infiltration des Gewebes erfolgt fast ausschließlich durch Makrophagen, die dann für die Demyelinisierung und die Abräumung des Zellschutts verantwortlich sind. Lassmann, Kitz und Wisniewski (159) geben eine mögliche Erklärung für die Demyelinisierungsvorgänge. Sie unterscheiden zwei Typen, welche auf Tiermodellen beruhen.

" Typ I: Im Meerschwein scheint sich folgender Mechanismus abzuspielen: In den perivenösen Cuffs werden Produkte aktivierter Lymphozyten zusammen mit Antikörpern hergestellt, welche die Demyelinisierung induzieren, indem sie Makrophagen veranlassen, an einem bestimmten Ort zu verharren, die Demyelinisierung durchzuführen (Myelin stripping) und den Zellschutt abzuräumen. In der Folge dieses Prozesses entsteht eine schwere Kapillarfibrose."

" Typ II: In der Ratte ist in den Anfangsstadien ein niedriger Makrophagenresponse festzustellen. Hier scheinen sich zwei Prozesse zu ergänzen. Produkte aktivierter Lymphozyten veranlassen Makrophagen dazu, Myelin abzubauen. Gleichzeitig werden lokale Zellen des Parenchyms, vielleicht Histiozyten, dazu veranlaßt, das Gleiche zu tun. Daher ist die Akkumulation der Makrophagen geringer und es erfolgt nur eine leichte Gefäßfibrose."

Bei der MS ist das "myelin stripping" der Makrophagen wie beim Meerschweinchen nie beobachtet worden. Außerdem gibt es Hinweise darauf, daß bei der MS der Myelinzerstörungs- und Abbauprozess wenigstens teilweise in lokalen Zellen erfolgt. (188 / 174 / 216). So scheint die MS eher dem Typ II nach Lassmann zuzuordnen zu sein.

Tabelle V: MORPHOLOGIE DER MS

DIE FRÜHE LÄSION

Histologischer Aufbau von innen nach außen.

Plaque: unscharf begrenzt.

Zentrale Venole und perivaskulärer Raum:

Um die zentralen Venolen Ansammlung mononukleärer Zellen (Lymphozyten und Makrophagen) und mit Einschlusskörperchen beladener Zellen. Auch außerhalb definierter Plaques befindet sich eine perivenöse Infiltration mit starker Blässe des Myelins und beginnender Myelindesorganisation.

Die Zone der Demyelinisierung:

völlige Demyelinisierung, d.h. Fehlen jeglichen Myelins

Die Zone plötzlich reduzierter Myelindichte:

stark verringerter Myelinanteil; Vorhandensein von Einschlüssen tragenden Zellen; Fettröpfchen;

Die Zone vermehrter Zelldichte:

schwaches bis mäßiges Cuffing der Gefäße;
Myelin normal; Infiltration durch Zellen mit kleinem dunklem Kern;

Meningen:

Es liegt eine Meningitis mit vorwiegend lymphozytärer Infiltration vor; variable Anteile an Makrophagen; Infiltration vor allem um die Gefäße und in der Tiefe der Sulci;

nach: 74⁶/ 100 / 107 / 188 / 214 / 216

siehe auch Abbildung 1. S.4.

III:2.3.Prinzipielles zur Demyelinisierung

Wie gezeigt, lassen sich schon auf Grund der Morphologie Hinweise dafür finden, daß Zellen am Geschehen der Demyelinisierung beteiligt sind. Neben den grundsätzlichen Typen der Demyelinisierung, wie primärer und sekundärer Demyelinisierung, lassen sich nach heutigem Wissensstand auch die, in der nachfolgenden Tabelle aufgeführten, theoretischen Modelle einer Demyelinisierung durch Immunprozesse denken.

Tabelle VII.:

GRUNDSÄTZLICHES ZUR DEMYELINISIERUNG

- A, " Primäre Demyelinisierung = segmentaler Myelinschaden ohne primäre Veränderungen im Axon
 - a. Demyelinisierung ohne Anwesenheit von Entzündungszellen. Beispiele: Diphtherie, Bleivergiftung, Diabetes
 - b. Demyelinisierung durch Entzündungszellen
Beispiele: EAE, EAN, Staupeencephalitis
- B, " Sekundäre Demyelinisierung
= wenn Myelinscheide und Axon gleichzeitig untergehen, wobei die Myelindegeneration eine Folge des Axonuntergangs ist
Beispiel: ischämische Nekrose."

(107 / 69, S. 132)

Tabelle VIII.:

Prinzipielle theoretische Möglichkeiten die Anwesenheit von Entzündungszellen vor der Demyelinisierung zu erklären.

1. " Tod der myelinisierenden Zelle durch einen infektiösen Organismus.
2. entzündliche Demyelinisierung durch eine Autoimmunreaktion:
 - a, direkte Myelinzerstörung durch sensitivierte lymphoide Zellen
 - b, Myelinschaden durch lösliche Mediatoren wie Antikörper und Toxine
 - c, Myelinschäden verursacht durch von Lymphozyten gesteuerte Makrophagen

d, Kreuzreaktion von Lymphozyten oder Antikörpern gegen Virusantigene, die mit Körperantigenen teilweise identisch sind.

3. Demyelinisierung als unspezifische Konsequenz einer Immunreaktion in der Nachbarschaft eines myelinisierten Nerven. "

(107 / 69, S.132)

Um die Hinweise aus der Morphologie noch zu bekräftigen, werde ich im Folgenden zusammenfassen, was in der Literatur bisher an zellulären Immunphänomenen bei der Multiplen Sklerose beschrieben ist.

III.3. ZELLULÄRE IMMUNPHÄNOMENE BEI DER MS

In seiner einfachsten Form teilt sich das Immunsystem in einen unspezifischen Schenkel (Makrophagen) und einen spezifischen Schenkel ein, der aus T- und B-Zellen besteht.

Soweit mir bekannt ist, wurden bisher keine Störungen der unspezifischen Abwehr bei MS Patienten berichtet. Es soll nun zusammengefaßt werden , was die bisherigen Untersuchungen zu dem zellulären System der T- und B-Zellen ergeben haben.

III.3.1. Die B-Zellen

Zuerst zu den B-Zellen, welche die Antikörperproduktion gegen verschiedene Antigene in Form der Plasmazellen bewerkstelligen. Bezüglich der Anzahl und Prozentverteilung der B-Zellen im peripheren Blut wurden bisher keine Unterschiede zu Normalpersonen festgestellt.

(257 / 200 / 224)

Desgleichen ergaben sich keine Unterschiede in der Immunglobulinverteilung im Serum. Im Liquor zeigten die Patienten jedoch einen auf dem 5% Niveau signifikant höheren IgG Anteil als Normalpersonen und Patienten mit anderen neurologischen Erkrankungen. (257)

Betrachtet man einige Arbeiten genauer, so scheint das Bild der humoralen Immunantwort nicht so ganz eindeutig

zu sein. Symington faßt dazu folgendes zusammen.

"Untersuchungen der Antikörperproduktion zeigten eine Hyperantwort auf eine primäre Herausforderung des Immunsystems mit einem bakteriellen Antigen, dem Flagellin. " (257). Davis et al. (67) haben dagegen folgendes erarbeitet. Bei einer aktiven Immunisierung mit keyhole limpet hemocyanin (Stoff aus einer bestimmten Napfschneckenart) hatten die Patienten bedeutend niedrigere Antikörpertiter während der ersten zwei Wochen nach der Immunisierung als die Normalpersonen und bis zu 28 Tage nach der Immunisierung hatten vier Patienten immer noch keine Antikörper ausgeprägt. Testete man dagegen die in vitro Antwort der Blutzellen auf diese Antigene, so waren keine Unterschiede festzustellen. 257 sagt: "Unstimulierte Antikörpertiter auf eine Reihe verschiedener viraler Antigene zeigten ein unterschiedliches Muster. Doch gab es als definitivstes Ergebnis einen signifikanten Anstieg der Serumtiterwerte gegen Masern- und Rötelnantigen im Vergleich zu den Kontrollgruppen. Es war ein Abfall der Titer gegen Influenza und ein Anstieg gegen Mumpsvirus festzustellen, der gegenüber den Normalpersonen signifikant war, worin sich die MS Patienten jedoch nicht von den Patienten mit anderen neurologischen Erkrankungen unterschieden. Es ergab sich aber keine Korrelation zwischen der Klinik und der Höhe der Antikörperspiegel. Die Antikörperspiegel im Liquor für Röteln und Masern unterschieden sich nicht von denen der Normalpersonen. "

Davis (67) sagt dagegen: "Es fanden sich keine Unterschiede in der Komplementbindungsreaktion (KBR) für Röteln, Mumps, Herpes simplex und Zytomegalievirus. Die Patienten waren zum Teil nicht in der Lage, bei einer Impfung mit Honkong-Virus, Antikörper zu entwickeln, oder hohe Titer zu erreichen. "

Dies läßt folgendes Resumée zu:

In mehreren Studien wurde eine Hyporesponsivität der humoralen Antikörperproduktion berichtet.

Sie beinhaltet eine verringerte Antikörperproduktion auf eine primäre Herausforderung mit den Antigenen keyhole limpet hemocyanin (68) und Typhus Vaccine (93) und es gab niedrigere unstimulierte Titer der Antikörper gegen Diphtherie- und Tetanustoxoid. (155).

Es ist möglich, daß es, wie Lamoureux et al. 1976 vorschlugen (155), bei der MS sowohl erhöhte als auch erniedrigte humorale Antworten auf verschiedene Antigene geben kann.

Man muß jedoch anmerken, daß in den zitierten Studien die Patienten nicht sauber nach Gruppen aufgegliedert waren, wie frühes Krankheitsstadium, spätes Krankheitsstadium und auf Debilität der Patienten und mögliche Veränderungen der Immunantwort durch liegende Katheter, Immobilisation e.t.c. keine Rücksicht genommen wurde. Denn es konnte von Lee et al. 1971 mittels eines Immunisierungsschemas gegen Flagellin gezeigt werden, daß chronische Erkrankungen für sich allein schon eine erniedrigte humorale Immunantwort bewirken. (161)

Als humorales Autoimmunphänomen wurde ein höherer Prozentsatz von Antikörpern gegen polymorphkernige Leukozyten bei der MS festgestellt, gegenüber normalen Kontrollen, während andere Autoimmunantigene wie Lymphozytenkerne, Parietalzellen des Magens, Schilddrüsenepithelzellen, glatte Muskulatur und Mitochondrien negativ waren. (257). In (165) fand sich noch folgender interessanter Befund: " Autologe Kombinationen von zusammen kultivierten T- und B-Zellen von MS Patienten antworten nur schlecht auf die Mitogene PWM (= pokeweed mitogen = Mitogen aus einer bestimmten Grassorte) und LPS (= lipo-polysaccharid = Stoff aus Bakterienwänden).

Sie bilden auf diese Stimuli hin eine bis auf 40% verringerte Anzahl von Plasmazellen, verglichen mit Normalpersonen.

Es lassen sich folgende Möglichkeiten für eine solche verminderte Antwort denken:

- verringerte Reaktivität der B-Lymphozyten bei MS
- Unfähigkeit der T-Zellen bei MS, eine den Normal-

personen entsprechende Unterstützung der T-Zellen zur B-Zellproliferation zu erbringen.

- ausgesprochene Suppression der Plasmazellen durch T-Zellen oder Makrophagen in den Mitogen stimulierten Kulturen. " (165)

III.3.2. Die T-Zellen

Nun zu den Ergebnissen im T-Zellschenkel der Immunantwort. Die absoluten T-Zellzahlen und Prozentanteile im peripheren Blut von MS Patienten sind normal. (257 / 200 / 203). Lisak et al. (169) und Allen et al. (4) fanden, daß die T-Zellzahlen mit der klinischen Aktivität der Erkrankung schwankten. Kam-Hansen (143) zeigte in seiner Arbeit, daß die T-Zellen des Liquors von MS Patienten einen niedrigeren Anteil von sogenannten aktiven T-Zellen als das Blut aufweisen. Er lieferte auch Hinweise darauf, daß sich im Liquor eine höhere Anzahl von T-Zellen als im Blut befinden. (144 / 145). Die Zellen im Liquor scheinen sich von denen des Blutes nur durch funktionelle Eigenschaften zu unterscheiden. Die Überprüfung dieser Funktion erfolgte mit Rosetten-
testen.

Wenn sich auch bezüglich der Gesamt T-Zellzahlen Differenzen der verschiedenen Autoren ergeben, so scheinen doch die Unterschiede in einem Bereich zu liegen, der sich zum größten Teil mit der Variationsbreite der Normalpersonen deckt, sodaß eine Unterscheidung im Einzelfall nicht möglich sein wird.

Es war nach der Entdeckung der verschiedenen Subpopulationen der T-Zellklasse nur natürlich nachzusehen, ob sich bei diesen Subklassen konsistentere Unterschiede würden finden lassen. Santoli et al. (237) hatten dazu folgende Ergebnisse : daß bei Patienten, von denen man nur eine einzige Blutprobe untersucht hatte, kein Zusammenhang zwischen der Zahl der T-Gamma-Zellen und dem Stadium der Erkrankung (Exazerbation oder Remission) feststellbar war, während sich bei Patienten, von denen Verlaufskontrollen möglich waren, die Anteile der

T-Gamma-Zellen sich mit Exazerbation und Remission verschoben, während bei gesunden Personen die Anteile bei ähnlichen Zeiträumen konstant blieben.

Die Richtung der Verschiebung war jedoch nicht immer die gleiche. Es fanden sich genausoviele Abnahmen der T-Gamma-Zellen im Schub wie Zunahmen. In Übereinstimmung mit Santoli fand Merrill (190) ebenfalls, daß etwa 75% der MS Patienten einen signifikant höheren Anteil an T-Gamma-Zellen besitzen, verglichen mit gesunden Kontrollen, wenngleich sich auch hier keine Unterscheidung des Krankheitsstadiums, akut oder Remission, auf Grund der Befunde treffen ließ.

Es wurden jedoch keine Longitudinalstudien erhoben, wie sie Huddleston und Oldstone (130) durchführten. Sie konnten als Ergebnis zeigen, daß die T-Gamma-Zellen mit dem Krankheitsstadium fluktuierten. Es konnte gleichzeitig (in 190) gezeigt werden, daß 30-50% der T-Gamma-Zellen bei MS auch Rezeptoren für T-Mü tragen, während dies bei gesunden Personen nur in 10% der Fall war.

Rein morphologisch orientierte Untersuchungen waren also bisher nicht in der Lage, ganz eindeutige Befunde bezüglich einer anormalen T-Zellverteilung zu finden.

Es wurden jedoch noch eine Reihe funktioneller Tests durchgeführt, die den T-Zellschenkel des Immunsystems überprüfen wollen. Es fehlen jedoch nach wie vor Tests, denen es gelungen wäre, eine Verbindung von Zellmorphologie einschließlich Oberflächenrezeptoren und Funktion herzustellen.

Nun zu einigen funktionellen Tests.

Es wurden Hauttests gegen eine Reihe ubiquitärer Antigene, wie z.B. Streptokinase durchgeführt und dabei wieder sehr inkonsistente Ergebnisse gewonnen.

Symington (257) berichtet über eine verringerte DTH Hautreaktion, wenn sie MS Patienten mit Normalpersonen verglichen, nicht jedoch, wenn sie MS Patienten auf solche mit anderen neurologischen Erkrankungen bezogen. Johnson und Miller (140) zeigten eine normale DTH im Vergleich zu Normalpersonen. (desgleichen 241)

Smith, Hughes und Hunter (249) fanden einen überproportionalen Anteil von Tuberkulin negativen Patienten unter den MS Kranken. Und Davis et al. (68) berichten über eine erniedrigte Immunantwort auf keyhole limpet hemocyanin. Die Stimulation von Lymphozytenkulturen mit PHA wurde von Lisak (167) in einer Übersichtsarbeit zusammenfassend dargestellt. Die darin von verschiedenen Autoren gesammelten Ergebnisse ergeben kein klares Bild, da die Kulturbedingungen zu sehr differieren und einige Studien in sich nicht ausreichend kontrolliert waren. Nach eigenen Untersuchungen (statistische Auswertung von über hundert Personen) hat diese Methode sowohl einen intra- als auch interindividuellen Schwankungsbereich von $\pm 100\%$, sodaß erhebliche Mittelwertsunterschiede auftreten müssen, um nachgewiesen werden zu können. Es dürfte jedoch nach allen bisherigen Untersuchungen davon auszugehen sein, daß wohl die üblichen Schwankungen im Wachstumsverhalten der Blasten vorhanden sind, die auf eine unterschiedliche Empfindlichkeit verschiedener Einzelpersonen gegenüber dem PHA zurückzuführen sind, aber ansonsten das Wachstumsverhalten von MS Lymphozyten auf dieses unspezifische Mitogen normal ist. Es wurde schon in den Jahren 1978/79 festgestellt, daß den oben erwähnten T-Gamma und T-Mü Zellen im Immunsystem eine definierte Funktion zukommt. So gilt für die T-Gamma Zelle: "Die T-Gamma Zelle des peripheren Blutes ist erst dann immunologisch aktiv, wenn sie mit Immunkomplexen reagiert hat. Die T-Gamma Zelle suprimiert die Produktion von Antikörpern durch die B-Zellen, wahrscheinlich durch eine Verhinderung der T-Helper Funktion auf die B-Zellen." (194/195/196) In einigen neueren Studien wurde gefunden, daß der Anteil der T-Gamma Zellen während des akuten Schubs der MS signifikant abnimmt und während der klinischen Remission überproportional zunimmt. Auch wurde gezeigt, daß bei longitudinalem Verfolgen der Patienten dieses Verhalten sich regelmäßig in der angegebenen Weise reproduzieren läßt. (130)

Antel et al. (11) entwickelten einen Assay, der in der Lage ist, unspezifische Suppression von Zellpopulationen untereinander aufzuzeigen. Er wies darin nach, daß bei MS Patienten eine unspezifische Suppressorfunktion, gemessen an der Fähigkeit Mitomycin (ein Mitosegift) blockierter, ConA (Concanavalin A = ein Blastenstimulans für T-Zellen) präaktivierter Lymphozyten, die Antwort frischer autologer Zellen auf ConA zu unterdrücken, während des Schubs unternormal ist und auf hohe bis normale Werte ansteigt, wenn die Remission beginnt. Die eben erwähnten Untersuchungen lassen sich auch dahingehend interpretieren, daß bei der MS Regulationsphänomene einen Rolle spielen können.

Zuletzt möchte ich dem Kapitel "Zelluläre Immunphänomene bei der MS" noch einige sehr interessante Aspekte hinzufügen, die engen Bezug zu den Untersuchungen haben, über die ich im experimentellen Teil berichtet habe.

Santoli et al. (136) versuchten einen Defekt in der Fähigkeit von Lymphozyten bei MS Patienten eine ADCC (antibody dependent cellular mediated cytotoxicity) oder CML (cellular mediated lympholysis) auszuüben, aufzuzeigen. Der CML Test wurde an SV 40 transformierten menschlichen Hautfibroblasten durchgeführt, desgleichen mit der menschlichen Zelllinie K 562. Als Target für die anti-körperabhängige Lyse (ADCC) wurden die Linien EB-P8 (Ebstein Barr Virus transformierte Zellen von einem MS Patienten), SB (B-Zelllinie eines Patienten mit lymphatischer Leukämie) und die Maus Mastozytomlinie P815Y verwendet, wobei anti-HLA Antiseren und ein Anti-Maus-Antiserum vom Kaninchen als Antikörperliferanten gebraucht wurden. Als Ergebnis dieser Studie wurde festgestellt: Wie auch schon bei gesunden Personen beschrieben, wurde eine große Variabilität in ADCC und CML, sowohl bei MS, als auch den hier verwendeten

Kontrollpersonen gefunden. Ungeachtet dessen, welche Target Zelle benutzt wurde, zeigt sich in beiden Ansätzen kein signifikanter Unterschied zwischen der Fähigkeit peripherer Lymphozyten, sowohl von Patienten, als auch von Normalpersonen, Zytotoxizität auszuüben. Im selben Assay wurde gezeigt, wenn man die peripheren Lymphozyten mit verschiedenen Stämmen von Masern und SSPE Virus (subacute sclerosing panencephalitis) infiziert, steigt das Ausmaß der Zytotoxizität stark an, jedoch zeigte sich wieder kein Unterschied zwischen den untersuchten Patienten und Normalpersonen. Es wurde auch noch die antivirale Interferonaktivität im Überstand infizierter Lymphozyten getestet. Die Menge des produzierten Interferons und das Ausmaß der Lyseverbesserung variierte direkt proportional zur Menge eingesetzten Virus, egal ob bei Patienten oder Normalpersonen.

Van den Noort und Etjernholm (198) koinkubierten Seren von MS Kranken mit normalen Lymphozyten in der Gegenwart von Uridin-5- H^3 (= mit radioaktivem Wasserstoff markierte Uridinbase). Die RNA-Synthese wurde durch Seren von MS Patienten bis zu 20% unterdrückt. Die Kontrollseren hatten diesen Effekt nur in ganz wenigen Fällen. Der lymphotoxische Effekt war am ausgeprägtesten bei Patienten mit akuten Schüben der MS und einem hohen Grad der Behinderung. (Kommentar: das Manko dieser an sich sehr interessanten Studie war, daß sich keine Normalpersonen im Ansatz befanden. Man möge sich nur einmal die Ergebnisse der zuvor zitierten Arbeit vor Augen halten. Es ist nicht von vorneherein selbstverständlich, daß Lymphozyten von Normalpersonen zytotoxische Effekte gegen humane Fibroblastenlinien haben. Genauso ist es nicht selbstverständlich, daß Seren von Normalpersonen keinen suppressiven Effekt auf normale Lymphozyten haben sollen.) Die zitierten Untersuchungen, über die bis jetzt berichtet wurde, waren mehr allgemein in Richtung auf zelluläre Phänomene bei der MS ausgerichtet. Aber bei all den unspezifischen Ergebnissen, die über zelluläre Phänomene berichten, stellt sich ganz folgerichtig

die Frage: Wogegen richten sich diese zellulären Phänomene, deren Existenz hier aufgezeigt wurde?

III.3.3. Gerichtete zelluläre Phänomene bei der MS

Und auch zu diesem Problem gab es schon einige Ansätze, über die jetzt berichtet wird.

Paula Dore'Duffy (73) beschreibt einen Assay, in dem sie überprüft, ob sich Blutzellen von Patienten und Kontrollen an frische und fixierte Gehirnschnitte des Menschen anlagern. Es ergab sich folgender Befund.

Eine kleine Population menschlicher T-Lymphozyten bleibt vorzugsweise an den myelinisierten Bereichen von Hirnschnitten hängen. Diese Fähigkeit ist bei Zellen von MS Patienten auf das dreifache erhöht. (Signifikant mit $p=0,01$). In der grauen Substanz wurde keine Adsorption von Lymphozyten gefunden. Es scheint also so zu sein, daß die Adsorption von Lymphozyten an Gehirnschnitte an die Gegenwart von Myelin gebunden ist und sich mit Beobachtungen vergleichen läßt, die von Kuttner und Woodruff (151) an Lymphozyten des Duktus thoracicus bei Ratten und EAE-Ratten berichtet wurden.

Monozyten wiesen diese Eigenschaft nicht auf und die Zugabe von Monozyten zu MS T-Zellen hob deren ausgeprägte Bindung an Myelin auf, wogegen die Zugabe von MS-Monozyten auf die Bindung keinen Einfluß hatte. Die Sensitivität von Lymphozyten von Patienten mit anderen neurologischen Erkrankungen lag im Bereich der gesunden Kontrollen. Alvord et al. (10) untersuchten die Wanderungshinderung bestimmter Lymphozyten durch verschiedene Konzentrationen physikochemisch aufgetrennter Hirnfraktionen. Sie fanden dabei Hinweise auf eine Leukozytensensitivität gegen P2B (vornehmlich Synaptosomenfraktion) in 5 von 6 MS Patienten und in 4 von 16 nicht-MS Patienten, sowie bei keiner der 4 Kontrollen. (Vergleiche 24, s. 319, wo beschrieben wird, daß in Synaptosomen basisches Myelinscheidenprotein enthalten ist.) In demselben Test wurden auch Fraktionen mit basischem Myelinscheidenprotein mitgetestet, wobei sich jedoch keine

Unterschiede zwischen den einzelnen Gruppen fanden.

In dieser Arbeit sind leider keine exakten Angaben über die Klinik der untersuchten Patienten enthalten; mit Ausnahme, daß der erste Fall, den diese Autoren untersuchten, ein Patient mit einem chronisch progredienten Verlauf war. Rocklin et al. (229) untersuchten mittels eines Testes, bei dem die Beeinflussung der Wanderungsgeschwindigkeit von Zellen durch Antigene getestet wird, an Meerschweinchenmakrophagen die Produktion von MIF (macrophage inhibiting factor) von kultivierten Leukozyten von MS Patienten. Die Kultur dieser Lymphozyten erfolgt in Gegenwart des Antigens, hier basisches Myelinscheidenprotein. Sie hatten als Ergebnis, daß Lymphozyten von 4 von 4 Patienten mit akuter und 3 von 11 mit chronischer MS, MIF produzierten, was sich in einer Reduzierung der mittleren Wanderungsfähigkeit auf 62% bemerkbar machte. Bei den akuten Patienten wurde die Untersuchung 2 Wochen bis 4 Monate nach Beginn der Symptome angestellt. Der macrophage inhibiting assay soll gut mit einer in vivo Hypersensibilisierung korrelieren. (229)

Dies ist eine der ersten Arbeiten, in der gezeigt werden konnte, daß bei MS Patienten eine zelluläre Antwort gegen ein bestimmtes Antigen zu bemerken ist.

Es handelt sich dabei um BE (basic encephalitogen), den Stoff, der zur Erzeugung der tierexperimentellen Modellkrankheit der MS verwendet wird. Da dieser Stoff möglicherweise den Schlüssel zur MS darstellt, wollen wir uns kurz mit diesem Protein beschäftigen.

III.4. DAS BASISCHE MYELINSCHIEDENPROTEIN

(basic encephalitogen = BE)

III.4.1. Biochemische und biologische Charakteristika des BE

Das BE ist ein Protein. Es besitzt ein Molekulargewicht von 18200 Dalton (44/92) und einen isoelektrischen Punkt von 10,5. (43) Auf Grund seines hohen Gehalts an Arginin und Lysin ist es kationisch. Wie die anderen basischen Proteine, z.B. Histone, besitzt es einen höheren Gehalt an Histidin und Prolin als sonstige Körperproteine. Weiter enthält es ein Mol Tryptophan pro Mol Protein. Seine Fähigkeit EAE auszulösen und mit Antikörpern zu reagieren wird nicht beeinträchtigt, wenn es mit 8M Harnstoff behandelt oder gekocht wird. Studien ergaben, daß bei diesem Protein die Tertiär- und Sekundärstruktur für die Antigenität weniger wichtig ist als die Primärstruktur. Diese besteht aus 170 Aminosäuren, deren sequentielle Reihenfolge bekannt ist, sowohl für den Menschen, das Rind, das Meerschwein, die Ratte, die Maus, als auch für einige Nichtsäuger. Die Sequenz ist in Lit. 112, S. 63 aufgeführt. Verschiedene Lipide, wie Cerebrosidsulfat und Triphosphoinositide bilden Komplexe mit dem Protein (206). Die Anwesenheit einer stark prolinhaltigen Region im mittleren Teil des Moleküls führte Brostoff und Eylar 1971 (37) dazu, eine haarnadelförmige Struktur zu postulieren, was dann 1973/74 bestätigt wurde (171/83).

Nun zu den biologischen Eigenschaften des BE. Es war schon länger bekannt, daß man mit dem BE eine Tierkrankheit erzeugen konnte, aber erst Laatsch et al. (152), Rauch und Raffael (222) und Kornguth und Anderson (148) konnten den Zusammenhang zwischen BE und Myelin herstellen, zu der Substanz also, die der weißen Substanz des Gehirns den Namen gibt.

Myelin besteht zu 23 % aus Protein und das BE stellt den Hauptanteil davon mit 30 % (81 / 91 / 103). Als Gesamtanteil berechnet stellt es 3 % des Trockengewichtes des

Gehirns (54, S.6). BE wurde in der intermediären Linie (71), in der Hauptlinie (281 / 211 / 125) und teilweise auch in der synaptosomalen Membranfraktion (281) der Myelinscheide gefunden.

Dies ist ein sehr wichtiger Befund, da er ganz deutlich demonstriert, daß BE als Bestandteil der Hauptdichtelinie, die ja die Oberfläche der Myelinzelle bildet, als Antigen auf der Zelloberfläche präsent sein kann.

Im intakten Gewebe sind jedoch zumindest die humoralen antigenen Determinanten des BE maskiert, und somit für die Antikörper des Blutes unzugänglich. (125 / 106 / 58 / 282) Dupouey et al. (79) kommen auf Grund ihrer Untersuchung zu der Schlußfolgerung, daß BE sich an der Innenseite der äußeren Membran des Oligodendrozyten befindet. Diese Feststellung wurde histochemisch an einer myelindefizienten Mutante der Maus getroffen.

Biologisch hat das BE eine Stütz und Gerüstfunktion. Denn wenn man in vitro BE mittels bestimmter Enzyme andaut, kann man morphologisch einen Zusammenbruch der Markscheide demonstrieren. (69)

III.4.2. Immunologische Charakteristika des BE

Bekannt sind vor allem die immunologischen Eigenschaften, die für einen Organismus fatale Folgen haben können: die Auslösung der EAE. Das BE wirkt aber nicht allein als Ganzes auf einen Körper. Den verschiedenen Sequenzen des BE sind verschiedene Eigenschaften zuzuordnen, zumindest was die Reaktion des Immunsystems betrifft. Im Meerschwein ist ein Peptid aus 9 Aminosäuren als das encephalitogene Peptid charakterisiert worden, dessen Struktur der eigentliche Auslöser für die Entzündung im ZNS ist. (88 / 269) Dieses Peptid, das einen Teil des BE darstellt, hat die Sequenz Phe-Ser-Trp-Gly-Ala-Glu-Gly-Gln-Lys und umfaßt die Positionen 114-122. (24)

Lamoureux et al. (156) haben durch Synthesversuche festgestellt, daß Proteine, die kein Tryptophan enthalten auch keine EAE auslösen können. Dies gilt jedoch nur für

das Meerschwein. In der Ratte ist auch eine Sequenz auslösend, die kein Trp enthält. Affen scheinen gegen das Nonapeptid sogar resistent zu sein. (90 / 138 / 221)

Neben diesen encephalitogenen Determinanten, von denen aber für eine Tierspezies auch mehrere verschiedene existieren können, gibt es andere Sequenzen, welche isoliert injiziert einen Schutz vor der Auslösung der Erkrankung bieten können. Hakan Bergstrand schreibt dazu (24) : "All die genannten Untersuchungen legen nahe, daß es entweder verschiedene encephalitogene oder protektive Stellen auf dem BE gibt, oder daß verschiedene krankheitsproduzierende oder schützende Zellpopulationen mit dem BE reagieren. Möglicherweise ist eine Kombination beider Möglichkeiten die wahrscheinlichste Erklärung."

Alvord und Eylar (7 / 85) haben auf Grund der erwähnten Befunde eine Balance zwischen krankheitsverursachenden und schützenden Determinanten des BE postuliert. Es ist weiterhin bekannt, daß das BE, ebenso wie Tuberkulin, eine verzögerte Hautreaktion vom DTH Typ auslösen kann, wenn es mit komplettem Freund'schem Adjuvans (CFA) in die Haut gespritzt wird. (242 / 208 / 7)

Im Meerschwein korreliert die Stärke der Hautreaktion auf homologes BE, zehn Tage nach Injektion, mit dem zeitlichen Auftreten und der Schwere der nachfolgenden Erkrankung. (242 / 168)

Swanborg (255) beobachtete, diesmal am Kaninchen, daß man das BE des größten Teils seiner encephalitogenen Determinante entkleiden kann, es aber trotzdem noch die Fähigkeit behält, eine DTH ohne EAE auszulösen, sodaß die oben genannte Assoziation von EAE und DTH nicht in allen Fällen gegeben sein muß.

Eylar (85) fand, daß man mittels einer Modifikation des Tryptophanrestes im BE mittels 2-hydroxy-5-nitrobenzylbromid zwar die Encephalitogenität des BE beseitigen kann, sich seine Fähigkeit eine DTH auszulösen aber nicht verändert. Zusammenfassend läßt sich sagen, daß es nun

als gesichert gilt, "daß wenigstens zwei Regionen des bovinen BE's, welche das Tryptophanpeptid nicht enthalten, in der Lage sind, im Meerschwein eine DTH auszulösen und allem Augenschein nach gibt es noch weitere solcher Regionen." (24)

(Übersichten dazu finden sich in 24 / 66 / 134 / 135 / 33 / 132 / 164 / 222 / 26 / 159 / 169)

Den Nachweis darüber, daß Zellen gegen ein Antigen sensibilisiert sind, versucht man mit verschiedenen Labormethoden zu erbringen. Eine davon ist der Lymphozytentransformationstest, wobei gemessen wird, in welchem Ausmaß die Zugabe eines Antigens zu einer Lymphozytenkultur die Aufnahme radioaktiven Thymidins in die Zelle beeinflußt. Diese ist proportional zur Mitoseaktivität. Eine erhöhte Transformierbarkeit wurde bei der EAE in verschiedenen Tierspezies bejaht für Lymphknotenzellen, (64) periphere Lymphozyten (25) und für Peritonealzellen. (166) Außerdem besitzt das BE auch antigene Determinanten, die für eine humorale Reaktion auf dieses Protein in Frage kommen. "Wie fast alle basischen Proteine ist auch das BE ein sehr schwaches Antigen für eine humorale Antikörperproduktion." (7). Es kann jedoch mittels spezieller Bedingungen so injiziert werden, daß es hohe Antikörpertiter liefert. (242 / 276 / 75) Eine Übersicht über die Antikörper provozierenden Regionen des BE findet sich in Literatur 24. Tafel 6.

Was die Lage der antigenen Strukturen betrifft, so legen alle bisher gewonnenen Daten klar, daß im Meerschwein und in der Ratte die encephalitogene Tryptophanregion weder Antikörperproduktion hervorruft, noch mit Antikörpern, die eine BE Spezifität aufweisen, reagiert. (153 / 154 / 156 / 163 / 164 / 86 / 55 / 162)

Zusammenfassend läßt sich zu den Ergebnissen im Tierversuch folgendes sagen: Es scheinen wenigstens 4 encephalitogene Regionen gesichert und die Existenz von 4 oder 5 anderen krankmachenden Determinanten wurde vermutet.

(24). Die Potenz der meisten dieser encephalitogenen Regionen ist ganz eindeutig von der Spezies abhängig. So war die Fähigkeit in Lewis Ratten EAE zu erzeugen, hauptsächlich an einen hochspeziespezifischen Teil des BE's von Meerschwein und Ratte gebunden, nicht jedoch an bovines BE. Meerschwein und Affe antworten auf andere mehr oder weniger speziespezifische Regionen, aber auch auf kleinere gemeinsame Determinanten, wohingegen das Kaninchen auf mehrere verschiedene Teile des BE's mit Erkrankung reagiert. (24)

Was die antigenen Determinanten betrifft, die in üblichen Assays für zelluläre Immunität getestet werden, scheint die Situation ähnlich zu sein. In vitro und in vivo Tests legen nahe, daß die Zahl antigener Determinanten, jetzt ungeachtet der Speziespezifität, wohl über 12 liegen wird. Obwohl es darüber unterschiedliche Berichte gibt, haben eine ganze Reihe von Untersuchungen eine Dissoziation zwischen krankheitsauslösenden Eigenschaften des BE und seinen Fähigkeiten, zelluläre Immunreaktionen zu induzieren, postuliert. Dies wurde an Beispielen wie DTH, migration inhibition Test oder Transformationstests gezeigt. Es gibt Hinweise, daß bestimmte Regionen eine zelluläre Immunantwort provozieren können, ohne daß sich eine begleitende Erkrankung ausbildet. Es wurde auch behauptet, daß auch die umgekehrte Situation, eine Erkrankung ohne begleitende Immunphänomene, existiert. Desgleichen wurde eine Dissoziation zwischen krankmachenden und protektiven Regionen auf dem BE postuliert. Eine logische Interpretation dieser Beobachtungen würde, wie Spitler et al. (250) es taten, die Existenz verschiedener antigenen/immunogener Regionen des BE fordern, die verschiedene lymphoide Zellpopulationen triggern. " Daher müßte die encephalitogene (oder suppressive) Aktivität einer bestimmten Region an die Fähigkeit geknüpft sein, eine Immunantwort in einer krankheitsfördernden (oder unterdrückenden) lymphoiden Zellpopulation zu induzieren. " (250)

Dabei kann man natürlich nicht erwarten, daß sich

Aktivität in Tests zeigt, die Zellfunktionen ganz anderer Teile des zellulären Immunsystems aufzeigen. Dies wäre als Erklärung für die verschiedenen beobachteten Dissoziationen des Immunsystems auf das gleiche Antigen denkbar. In neuerer Zeit mehren sich die Hinweise dafür, daß die Immunantwort gegen BE nicht nur als Ausdruck einer antigenen / immunogenen Determinante im Hinblick auf die zelluläre Immunität betrachtet werden kann, sondern auch von der Anwesenheit und der Art benachbarter Sequenzen abhängt. Das bedeutet, daß sich in vivo Konformationsunterschiede und Einkleidung in Lipide e.c.t. in einer unterschiedlichen Antigenität und Immunantwort äußern werden. Die Komplexität dieses Geschehens ist noch nicht ausreichend geklärt.

Wie gerade gezeigt, ist schon im gut reproduzierbaren Tiermodell die Natur der Immunantwort auf BE nicht ganz einfach darzustellen und auch noch nicht in allen Einzelheiten bekannt. Um wieviel schwieriger wird es dann sein, die Situation am Menschen zu erforschen, wo ethische Gründe es verhindern, Experimente wie am Tiermodell durchzuführen.

Trotzdem gab es schon eine ganze Reihe von Versuchen, einen Zusammenhang zwischen BE und demyelinisierenden Erkrankungen des Menschen nachzuweisen. Damit wollen wir uns im Folgenden beschäftigen. Dies am Beispiel der Multiplen Sklerose, die die wichtigste, weil häufigste demyelinisierende Erkrankung darstellt.

III.5. Bisher bekannte Phänomene über eine Beteiligung des BE's bei der Multiplen Sklerose.

Die wichtigste Voraussetzung, daß das basische Myelinscheidenprotein beim Menschen eine Rolle spielen kann, ist, daß es überhaupt existiert. Hashim hat in Lit. 112 die Sequenz des BE beim Menschen genau besprochen. Die Sequenz wurde 1971 von Carnegie (42) zum ersten Mal beschrieben, nachdem 1967 von den gleichen Autoren die Methode der Gewinnung des Proteins aus Gehirnen von EAE Tieren dargestellt wurde. (44)

Die Besprechung von Hashim (112) erläutert die genauen Unterschiede in der Sequenz von menschlichem und verschiedenen tierischen BE's und einige molekulare Besonderheiten. Wie auch schon im Morphologieteil besprochen, stellt der Zusammenbruch des Myelins das wesentliche Charakteristikum der MS Läsion dar. Man kann auch mit speziellen Färbestoffen den spezifischen Mangel an BE in einer Läsion herausheben. (69, S.93 und die dort aufgeführte Arbeit von Hallpike und Bayliss 1971).

Der Beweis für die Effektivität des menschlichen BE's ist vollbracht, indem Lennon et al. 1970 (164) und Eylar 1972 (87) mit menschlichem BE und durch Enzymspaltung davon erhaltenen Fragmenten in der Ratte EAE erzeugen konnten.

Starke Hinweise auf eine eventuelle Rolle des BE bei der Multiplen Sklerose wären gegeben, wenn man einige der nachfolgenden Parameter in den Patienten aufzeigen könnte:

- das Vorhandensein von BE in irgendeiner Form in den Körperflüssigkeiten Blut oder Liquor während des Schubs, da dies bei Normalpersonen dort nicht vorhanden ist.
- der Nachweis, daß immunkompetente Zellen aus den Körpergeweben von Patienten gegen dieses Antigen sensibilisiert sind.
- der funktionelle Nachweis, daß man in der Lage wäre mit Zellen aus dem Gewebe der Patienten, eventuell auch mit Antikörpern, in vitro an Kulturen myelinisierter Zellen eine Zerstörung nachzuweisen.
(Ausschluß von Histokompatibilitätsproblemen)
- den Nachweis einer DTH Hautreaktion auf BE.

Einige dieser Punkte sind in der Literatur bereits abgehandelt. Die Anwesenheit von BE im Liquor ist jetzt gesichert. (57 / 108 / 189 / 271). Die erste Arbeit darüber erschien 1970 (124) und wurde 1972 bestätigt. (189).

1976 und 1978 erschienen dann die bisher besten Arbeiten zu diesem Thema mit Daten von 600 Patienten. (59 / 9).

Das Besondere an der Arbeit ist auch die klare Gliederung des klinischen Zustandsbildes der Patienten in definierte Klassen. Diese Arbeitsgruppe entwickelte einen Radioimmunoassay für BE, dessen untere Nachweisgrenze bei 4ng/ml liegt.

Sie teilten ihre Patienten folgendermaßen ein:

"Patienten mit weniger als 5ng/ml werden als negativ, Patienten mit einer Konzentration zwischen 6 und 15ng BE/ml werden als schwach positiv und Patienten mit Werten über 16ng BE/ml als positiv eingestuft." Es wurden 697 Patienten untersucht. Dies beinhaltete 91 Proben von MS Kranken, 6 Proben von Patienten mit anderen aktiv demyelinisierenden Erkrankungen und 600 Patienten mit nicht demyelinisierenden neurologischen Erkrankungen. Die 42 MS Patienten, die gerade eine akute Verschlechterung ihrer Erkrankung durchmachten, hatten durchwegs höhere Spiegel als 16ng/ml. 16 von 22 Patienten der langsam progressiven Form hatten Liquorspiegel zwischen 6 und 15ng/ml. Die Patienten mit der inaktiven Form der MS hatten alle Spiegel unter 5ng/ml. Es wurden auch bei einigen Patienten Verlaufskontrollen durchgeführt, vor, während und 10-30 Tage nach den Schüben. Die Liquorspiegel des BE stiegen und fielen mit der Exacerbation. Generell kehrten die BE Spiegel im Liquor mit der Verbesserung des klinischen Stadiums zum Normalniveau zurück. Die Kategorie der 6 Fälle mit sog. Myelinopathien enthielten Patienten mit transverser Myelitis, metachromatischer Leukodystrophie, zentral pontiner Myelolyse, adrenale Leukodystrophie und eine unbekannte hereditäre Leukodystrophie. Diese Patienten hatten ebenfalls erhöhte BE Spiegel im Liquor, die von 8-100ng/ml reichten, jedoch zu 50% unter der als positiv angegebenen Grenze von 16ng/ml lagen. Bis jetzt war bei 25% der Patienten mit Neuritis nervi optici BE im Liquor nachweisbar, bei keinem über der 16ng/ml Grenze. Die Neuritis nervi optici wird aber gerne als ein Vorläufer der MS betrachtet. Deshalb werden all diese Patienten nachuntersucht, um das Ergebnis

eines eventuellen ersten Schubs einer MS erhalten zu können. Alle mit Ausnahme von drei Patienten aus den 600 Kontrollen hatten weniger als 6 ng/ml BE im Liquor. Es handelte sich bei diesen Personen um Patienten mit ausgedehnten Infarkten der Medulla und des Hirnmantels, sowie um eine Person mit einer Strahlennekrose des Gehirns, sodaß es ein erstaunliches Ergebnis gewesen wäre, wenn man kein Myelin gefunden hätte. (56)

1980 auf dem 4. Internationalen Kongress für Immunologie präsentierte P.Y. Paterson Ergebnisse über den Nachweis von BE Fragmenten auch im Serum von MS Patienten.

" In Patienten mit MS waren hochaffine oder mittelaaffine BE Fragmente oft mit schweren Exazerbationen der Erkrankung verbunden. Die BE Fragmente, die durch eine in vivo Degradation durch Proteasen des Patientenserums entstanden, waren nicht in der Lage in Ratten EAE zu erzeugen. Nichtsdestotrotz verhindern sie EAE in Tieren, die man mit ganzem BE immunisierte. "

Zu diesem Thema war vorher schon eine wichtige Arbeit von Alvord (9) erschienen.

" Mehrere Untersucher (46 / 58 / 59 / 108 / 189 / 271) haben berichtet, daß der Liquor , speziell von MS Patienten, Material enthält, das mit basischem Myelinscheidenprotein kreuzreagiert. Da Liquor auch eine Reihe von proteolytischen Enzymen enthält (61 / 62 / 225 / 226 / 227) und da BE sehr empfindlich gegen Proteolyse ist, (6 / 22 / 38 / 40 / 63 / 77 / 147 / 175 / 176 / 177 / 178 / 179 / 197 / 246 / 247 / 248 / 249 / 270), ist es unwahrscheinlich, daß BE im Liquor als ein ganzes Molekül existiert, sondern eher als eine Reihe kleinerer Peptide und Fragmente. BE enthält eine Reihe antigener Determinanten, welche mehr oder weniger in den von Enzymen veränderten Fragmenten erhalten bleiben. (8 / 76 / 78 / 146 / 160). In Lit. 9 konnte gezeigt werden, daß auch die kleinsten Fragmente des BE noch in der Lage waren, Antikörper, die gegen BE gerichtet sind, zu binden."

Das bisher gesagte demonstriert ganz deutlich, daß beim

akuten Schub der MS BE frei wird und dies mit den klinischen Parametern korreliert. Das bedeutet jedoch nicht unbedingt, daß das Immunsystem gegen dieses Antigen sensibilisiert ist, obwohl es natürlich theoretisch als Ursache für die Freisetzung des BE in Blut und Liquor in Frage käme. Es wäre denkbar, daß sich das Immunsystem erst nach der Freiwerdung des Antigens durch einen anderen Prozess (z.B. eine slow virus Infektion) sensibilisiert. Dies zu unterscheiden ist erst dann möglich, wenn eine Immunantwort gegen das BE nachgewiesen werden kann. Ist das einmal geschehen, kann durch einen Vergleich des zeitlichen Auftretens von zellulärer Immunität gegen BE und dem Freiwerden von BE im Liquor auf eine Reihenfolge der natürlichen Abläufe geschlossen werden. Bei all diesen Überlegungen besteht immer noch die Möglichkeit, daß eine slow virus Infektion das Antigen freisetzt. Das Immunsystem des Körpers sensibilisiert sich gegen das nicht der Autotoleranz unterliegende BE des Gehirns und der nachfolgende Prozess der Exazerbationen und Remissionen erfolgt nach den Gesetzen der Immunregulation mit einer individuellen Dynamik. Doch wollen wir zuerst einmal die grundsätzliche Möglichkeit einer Sensibilisierung der zellulären Immunabwehr gegen BE abklären. Betrachten wir zuerst den Antigen stimulierten, Rosetten bildenden T-Zell Assay, kurz AgARFC Assay genannt. Unter geeigneten experimentellen Bedingungen binden periphere Blutlymphozyten heterologe Erythrozyten, um Mikrocluster zu bilden, welche als Rosetten bekannt sind. (244 / 283). Es wurden zwei verschiedene Rosetten bildende T-Zellpopulationen beschrieben. Die aktiv Rosetten bildenden Zellen (ARFC), eine Untergruppe der T-Zellen, bilden Rosetten, wenn sie mit heterologen Erythrozyten inkubiert werden. (283) Kürzlich wurde eine andere Untergruppe der T-Zellen entdeckt, mit Hilfe des Antigen stimulierten, Rosetten bildenden Assay. (AgARFC). Die Entwicklung des AgARFC war an die Beobachtung geknüpft, daß nach einer Inkubation peripherer Lymphozyten mit Spuren eines sensiti-

vierenden Antigens die Zahl der Rosetten bildenden Zellen ansteigt. Besonders relevant an dem gerade Betrachteten ist der AgARFC gegen BE, um eine zelluläre Sensibilisierung bei MS Patienten zu untersuchen.

Alle in dieser Arbeit untersuchten Patienten hatten eine Anamnese von klinischen Exazerbationen und Remissionen in Bezug auf das Nervensystem. Lymphozyten aus dem peripheren Blut von klinisch inaktiven Patienten zeigten erhöhte Spiegel Rosetten bildender Zellen nach einer in vitro Stimulation mit BE. Der Rosettenassay war myelin-spezifisch, weil ein Kontrollassay mit einem ebenfalls basischen Protein, nämlich Histonen, dies nicht zeigte. Eine Sensibilisierung gegen BE wurde auch bei Patienten mit zentralnervösen Tumoren oder cerebrovaskulären Erkrankungen beobachtet, sobald die klinischen Symptome auftraten. Während diese Patienten ein Absinken der Zahl der sensibilisierten Zellen im Laufe der Zeit zeigten, blieb der AgARFC bei MS Patienten, deren Zustand klinisch über Monate und Jahre stabil war, konstant positiv. (112 / 115).

Sheremata zeigte eine zelluläre Hypersensitivität gegen BE mit einem MIF Assay, der in vivo einer DTH Reaktion gegen BE entsprechen würde. (243). Lymphozyten von 48 Patienten mit MS und 24 Normalpersonen wurden in Gegenwart von humanem BE kultiviert und ihre Überstände im MIF Assay gegen normale Peritonealmakrophagen vom Meerschwein getestet. " Die Kontrollen zeigten eine mittlere Wanderung von 97%, die Patienten hingegen eine von 73%. Zwölf Patienten mit der Verdachtsdiagnose MS hatten eine mittlere Wanderung von 74%. Dreizehn Patienten mit einer akuten probable MS zeigten eine Wanderung von 61% und zwölf rekonvaleszierende Patienten eine von 78%." " Elf chronische Patienten, welche sechs Wochen oder noch später nach einer Exazerbation untersucht wurden, zeigten nur noch einen Wert von 91%. Die Ergebnisse weisen deutlich auf eine zeitliche Relation zwischen der Produktion von MIF Faktor durch BE und den klinischen MS Schüben hin."

Zusammenfassend läßt sich aus dieser Studie schließen, " daß eine definitive Hypersensitivität gegen BE in MS Patienten vorkommt, und daß sie zeitlich an die akuten Schübe der Krankheit gebunden ist."

Die Ergebnisse in der Gruppe der Patienten mit der Verdachtsdiagnose MS sprechen gegen die Möglichkeit, daß die in vitro nachweisbare Hypersensitivität eine Sensitivität reflektiert, welche erst während des MS Schubs erworben wurde. Denn es ist unwahrscheinlich, daß alle Patienten sich eine solche Hypersensitivität innerhalb von Zeiträumen aneignen konnten, welche von zwei Tagen bis drei Wochen reichten. Ein gutes Beispiel dafür ist jener Patient, der 6 Monate zuvor eine Monoparese hatte und gerade dabei war sich zu erholen und der im Test die niedrigsten Werte überhaupt hatte und der zwei Tage nach dem Test ganz plötzlich auf dem rechten Auge erblindete. (243) (Ergebnisse bestätigt durch 14 / 16 / 60).

Mills, Oppenheim und Hirschhorn (128 / 193 / 204) haben gezeigt, daß die Ergebnisse eines Lymphoblastenresponse auf ein Antigen mit einer Hautreaktion vom DTH Typ korreliert und bei anderen klinischen Syndromen, bei denen die zellulär vermittelte Hypersensitivität gestört ist (DiGeorge Syndrom, Lymphome), sich keine Lymphozytentransformation erzielen läßt. Diese Resultate weisen darauf hin, daß eine Lymphozytentransformation mit Hauttests und daher auch mit zellulär bedingter Immunität korreliert.

Versuche mittels einer Lymphozytentransformation einen Zusammenhang zwischen BE und MS nachzuweisen, gehören zu den ersten immunologischen Untersuchungen bei der MS überhaupt. Schon 1963 konnten Hashem und Barr (110) zeigen, indem sie Tollwutimpfstoff als Antigen benutzten (der Impfstoff war damals mit Gehirnbestandteilen verunreinigt), daß Lymphozyten einiger MS Patienten eine zellulär bedingte Hypersensitivität gegen Hirngewebe aufwiesen.

Die ersten Versuche einen Blastenresponse auszulösen, erfolgten durch Zugabe von Liquor zu kultivierten

Lymphozyten. Der Effekt von Liquor auf Blutlymphozyten ist widersprüchlich. Die erste Publikation beschrieb eine Blastentransformation (95) und zwei spätere Berichte bestätigten das. Alle drei Untersucher benutzten morphologische Kriterien zur Feststellung der Blastentransformation. Caron (45) stellte die Ergebnisse in Frage, indem er behauptete, daß Makrophagen irrtümlich als Blastenzellen bezeichnet worden sind.

Oppenheim und Wolff (205) zeigten, daß Makrophagen in vitro keine DNA synthetisieren. Die Bestimmung der radioaktiven Thymidinaufnahme in den Zellkern kann deshalb dazu benutzt werden, zwischen Blastenzellbildung und Makrophagen zu unterscheiden. Verschiedene autoradiographische Studien unterstützten die These von der Blastentransformation durch Liquor nicht, auch eine Arbeit von Källen, der eine Flüssigkeitsszintillations-technik benutzte, tut das nicht. (142)

Zelluläre Veränderungen, die einer Blastentransformation ähneln, ereignen sich zweifellos in den mit Liquor behandelten Kulturen. Eine Möglichkeit ist, daß sich Lymphozyten in Blasten umwandeln, aus irgendeinem Grund dabei aber keine DNA synthetisieren. Källen (142) untersuchte daher die RNA Synthese, aber die einzige Auswirkung war, daß er einen leichten und statistisch nicht signifikanten depressiven Effekt von Liquor sowohl auf Kontrollzellen, als auch auf Zellen von MS Patienten fand. So sinnvoll diese Untersuchungen sein mögen, wenn man die schon erwähnte Tatsache in Betracht zieht, daß sich im Liquor von MS Patienten BE nachweisen läßt, so wenig aussagekräftig waren die bisherigen Ergebnisse. Eine Transformation konnte nicht nachgewiesen werden. Im Gegenteil, Liquor hat möglicherweise einen toxischen Effekt auf Kontrollzellen, aber mit Sicherheit einen toxischen Effekt auf MS Zellen. (142)

Wenn man Befunde von Paterson zugrundelegt (209), könnte man als Erklärung dafür anbieten, daß die BE Spaltprodukte, wie sie im Liquor vorliegen, einen suppressiven Effekt auf die Lymphozyten ausüben.

Paterson konnte zeigen, daß die Spaltprodukte des BE, wie sie in seinem Fall durch Serumenzyme entstanden, Ratten vor der Induzierung einer EAE schützen konnten. Die Spaltprodukte durch Liquorenzyme unterscheiden sich nicht wesentlich von denen des Serums. (9).

Als dann in der folgenden Zeit die Methoden aufkamen, die es erlaubten, den encephalitogenen Faktor aus dem Hirngewebe, das BE, in reiner Form darzustellen und seine Funktion als Krankheitsauslöser zu beweisen, wurden auch Untersuchungen durchgeführt, mit dem Reinstoff BE eine Lymphozytentransformation zu erreichen. Über positive Ergebnisse mit basischem Protein berichten Bartfeld und Atoynatan (15), Brockman und Stiffey (34), Dau und Paterson (65), Frick und Stickl (96), sowie Webb (265) und Colby (60).

Negative Ergebnisse publizierten Koulischer und Stenuit (150), Jensen (139), Brody (35), Behan (20) und Källen und Nilson (142). Hughes et al. (132) fanden nach Zugabe von BE nur eine gering vermehrte Transformationsrate, die sie für nicht signifikant hielten. Offner (202) und Gosseye-Lissoir (104) fanden zwar eine positive Lymphozytentransformationsrate bei MS Patienten, aber ebenso in einem nicht zu übersehenden Prozentsatz auch bei Patienten mit anderen neurologischen Erkrankungen.

Es finden sich hier also sehr widersprüchliche Ergebnisse, die nicht unter einen Hut gebracht werden können. Es gibt jedoch dazu grundsätzlich ein paar Bemerkungen zu machen, die mögliche Ursachen für diese Differenzen aufzeigen könnten. Betrachtet man die methodischen Ansätze, so sind keine prinzipiellen Unterschiede festzustellen, jedoch in den Details der Ausführung sehr wohl. Es gibt fast keine Arbeit, die die gleichen Kulturbedingungen benutzt. Die verwendeten Zellkonzentrationen reichen von 5×10^5 Zellen /ml bis 5×10^6 Zellen/ml, die Antigenkonzentrationen von 5-200 microgramm BE pro ml Lymphozytenkultur. Die geringsten Unterschiede bestehen noch in der Kulturdauer der Ansätze, die fast alle zwischen 5 und 6 Tagen liegen.

Nur wenige Arbeiten haben Mehrfachansätze mit mehreren BE Konzentrationen durchgeführt, um eine Konzentrations-titrationskurve auszutesten. Ein Hauptmanko liegt, wie schon vorher ausgeführt in der mangelnden klinischen Einteilung der Patienten. Kaum eine Studie trifft präzise Unterscheidungen zwischen Patienten im Schub und Patienten in der Remission. Nur selten sind die Kriterien über die Zuteilung zur Studie angegeben.

1979 erschienen noch zwei Studien von Wicher (278 / 279), welche einen neuartigen Ansatz vorstellen: die Doppelstimulation. Periphere Blutlymphozyten von 45 Patienten mit MS, 12 Patienten mit anderen neurologischen Erkrankungen und 27 gesunde Kontrollpersonen wurden mittels des Doppelstimulationsansatzes untersucht. Dieser basiert auf einer Con A Nachstimulation von mit BE vorbehandelten Lymphozyten. Eine verstärkte Blastenantwort auf BE von 90-220% wurde in MS Patienten beobachtet, deren Krankheitsstadium als akut eingestuft wurde, während sich bei inaktiven MS Patienten eine unterdrückte Stimulation von 17-120% fand. Das Ergebnis war für $p = 0.01$ signifikant. Die Ergebnisse von Lymphozytenstimulationen bei der MS unterschied sich auf dem 0.05% Niveau von den zwei Kontrollgruppen. Die Transformationen konnten bei allen Patienten mit der gleichen BE Konzentration erreicht werden. Die verstärkte oder erniedrigte Immunantwort auf BE zeigte keinen Zusammenhang mit gleichzeitig getesteten zellulären Reaktionen auf weit verbreitete Antigene wie Candida, Streptokinase und Streptodornase. Die meisten Lymphozyten der Normalpersonen zeigten Stimulationen von 100% auf das BE. In ganz wenigen Fällen fand sich jedoch auch in dieser Gruppe etwas Stimulation oder Suppression. In 279 zeigten die gleichen Autoren mit demselben Ansatz eine Suppression von Lymphozyten von Patienten im inaktiven Stadium einer MS, verglichen mit Normalpersonen, wobei sie zusätzlich zeigen konnten, daß das Ausmaß der Suppression von der Konzentration des BE im Vorstimulationsversuch abhängig war.

Als interessantester und direktester Versuch dem Problem BE und MS auf die Spur zu kommen, dürfte wohl die Arbeit von Frick und Stickl 1980 (97) zu sein. Bei diesem Ansatz werden Hühnchenerythrozyten mit Tannin behandelt, mit BE beschichtet und dann mit radioaktivem Chrom 51 markiert. Als Effektorzellen werden Milzzellen von SPF-NMRI Mäusestämmen benutzt, zu denen Serum oder Liquor von MS Patienten gegeben wird.

Das theoretische Konzept dazu lautet: Im Serum b.z.w. im Liquor der Patienten befinden sich Antikörper gegen BE, die die Effektor-Lymphozyten benutzen, um die mit dem Antigen beschichteten Hühnchenerythrozyten im Sinne einer ADCC zu lysieren.

Zusammenfassend erbrachte diese Studie folgendes Ergebnis: Im Serum von 166 von 200 MS Patienten konnte ein Antikörper nachgewiesen werden, der die Effektor-Lymphozyten in die Lage versetzt, eine antibody dependent cellular mediated cytotoxicity gegen BE durchzuführen. Das Ausmaß der ADCC korrelierte mit dem Krankheitsstadium aktiv oder inaktiv, (positiv in 94% der Patienten mit aktiver MS; positiv in 62% der inaktiven Patienten;), war aber unabhängig vom Typ der Erkrankung, d.h. ob schubförmig oder chronisch und zeigte keine Korrelation zur Schwere der Klinik beim einzelnen Patienten. Kontrollstudien an 200 Patienten mit anderen organischen neurologischen Erkrankungen ergaben ebenfalls in einigen Prozent positive Ergebnisse: bei 7,5% der Karzinompatienten, bei rheumatoider Arthritis in 10-15% und bei Syphilis in 30%. In 55 von 57 Liquorproben von MS Patienten ergab sich ebenfalls eine positive ADCC, die praktisch identisch mit dem Ausmaß der Lyse in den Serumproben der gleichen Patienten war. Diese Untersuchung liefert also ziemlich gute Hinweise auf eine Beteiligung einer ADCC gegen BE am Krankheitsprozess der Multiplen Sklerose.

III.6. Ausblick

Auf Grund aller bisher angeführten Überlegungen, scheint es nicht unbillig zu sein, davon auszugehen, daß das BE mit dem Krankheitsverlauf der MS etwas zu tun haben wird. Nach wie vor ist ungeklärt, ob das BE als patho-ätiologischer Faktor in Frage kommt. Sicher scheint jedoch zu sein, daß im Verlauf der Erkrankung das Immunsystem gegen das basische Myelinscheidenprotein sensibilisiert wird und die weiteren Schübe von einem Regelspiel aktivierter und suppressiver immunkompetenter Zellen gesteuert werden.

Diese Überzeugung hat sich schon soweit durchgesetzt, daß Therapieversuche mit BE bei MS Patienten durchgeführt wurden. Man ging dabei von der Überlegung aus, daß wenn immunkompetente Zellen zu einem Angriff auf ihr Antigen, in diesem Fall das BE der Myelinscheide, übergehen, sie einen Rezeptor an ihrer Oberfläche tragen müssen, der das Antigen erkennt. Gibt man nun BE in löslicher Form in die Blutbahn, müßte sich theoretisch das injizierte BE an die Rezeptoren der angreifenden Zellen legen und diese somit in der Ausübung ihrer Funktion behindern. (102 / 41 / 17, S. 419-435).

Bis jetzt waren diese Versuche recht zwiespältig. Dafür lassen sich viele Möglichkeiten denken, die die Therapie der MS wohl grundsätzlich schwierig machen. - Durch die Blockade der Rezeptoren auf ihrer Oberfläche werden die angreifenden Zellen erstens zur Teilung angeregt, zweitens dazu, die Zahl der spezifischen Antigen erkennenden Rezeptoren zu erhöhen. Unterläßt man es also, laufend das BE nachzuspritzen, um in einen steady state mit der Rezeptorproduktion zu kommen, so werden die immunkompetenten Zellen bald das Übergewicht wiedererlangen.

- Das BE wird in der Blutbahn sehr schnell abgebaut. Wie schon vorher gezeigt, bleibt dabei großteils der Anteil der im Tierversuch relevanten antigenen Determinanten erhalten. Es werden aber auch diejenigen Fragmente bleiben, denen Paterson einen protektiven Effekt zuschreiben konnte. Man wird also das Immunsystem wohl

zu gleichen Teilen in seinen krankmachenden und protektiven Anteilen stimulieren. Das bedeutet, der Effekt ist plus minus Null. Als Konsequenz ergibt sich daraus, daß man das BE in vitro enzymatisch auf eine Größe zerkleinert, die für Serumenzyme nicht mehr angreifbar ist. Man wird dann durch einen speziellen Trennungsprozess die protektiven Fragmente abtrennen und diese dann zur Therapie benutzen. (Auf diese Möglichkeit hat schon Hashim in Lit. 112 hingewiesen.) Der andere Lösungsansatz wäre, das Protein an ein Molekül zu koppeln, das einen enzymatischen Abbau durch Serumenzyme verhindert. Es wäre dabei eventuell an Polyvinylpyrrolidon zu verweisen, das per se eine aktivierende Wirkung auf Suppressorzellen hat. Die Literatur über diesen Stoff ist inzwischen sehr umfangreich geworden.

- Es wird wohl immer schwierig sein, in Bezug auf die Klinik folgendes zu bewerkstelligen: beim ersten Schub einer MS die Diagnose zu stellen und das BE anzuwenden, um die neurologischen Defizite in ihrem Ausmaß zu verringern. Da 40% aller Patienten innerhalb weniger Stunden die Spitze ihrer Symptome erreichen und 70% innerhalb einer Woche, ist es allein schon ein zeitliches Problem. Es wird auch immer ein Problem sein, Patienten mit bekannter, auf MS verdächtiger Vorgeschichte, rechtzeitig in die Klinik zu bekommen. Aus eigenen Anamnesen ist bekannt, daß Patienten bis zu drei Wochen versuchten zu Hause mit ihren neu aufgetretenen Problemen zurechtzukommen, bevor sie sich in ärztliche Hände begaben.

- Man wird auch immer im Verzug sein, gegenüber den angreifenden Zellen, da ein Teil der Wirkung auf der Induktion suppressiver Faktoren oder Zellpopulationen des Immunsystems beruht. Dies nimmt einige Zeit in Anspruch. Man könnte vielleicht versuchen mittels einer Dauermedikamentation bei Verdacht auf MS das Ausbrechen neuer Schübe zu verhindern, was wohl Probleme in Richtung einer Serumkrankheit oder Amyloidose aufwerfen wird.

Ich glaube nämlich nicht, daß sich menschliches BE in

ausreichender Menge beschaffen läßt, um Speziesunterschiede auszuschalten. Bei der Gewinnung von BE aus Rinderrückenmark wird dieses schon wenige Minuten nach dem Tod des Tieres gewonnen und sofort stark gekühlt. Tut man dies nicht, wird das BE von den in großer Menge freiwerdenden autolytischen Enzymen total zerstört.

- Bei älteren Patienten mit bereits abgelaufenen Schüben, wird es auch bei einem erfolgreichen Therapiekonzept mit BE nie möglich sein, schon vorhandene neurologische Defizite zu bessern.

Trotz aller dieser Schwierigkeiten sollte man versuchen, alle theoretischen Grundlagen für eine Verwirklichung eines Therapiekonzeptes herauszufinden und alles zu tun, um es dann in die Tat umzusetzen.

Ich hoffe mit der vorliegenden Beschreibung über eine Forschungsarbeit, die autoreaktive, gegen BE gerichtete Zellen bei MS Patienten zum Gegenstand hat, einen kleinen Beitrag dazu geleistet zu haben.

IV. ANHANG

IV.1. LISTE DER VERWENDETEN MEDIEN UND GERÄTE

IV.1.1. Kultur und Waschmedien

RPMI 1640 (Rohmedium)

Es handelt sich um einen Beutel Trockenpulver, ausreichend für die Herstellung von einem Liter Rohmedium.

Firma Gibco. Katalog Nummer 430-1800

Es enthält folgende Inhaltsstoffe:

- anorganische Salze
- Glukose
- Gluthathion reduziert
- Phenolrot
- Aminosäuren
- Vitamine

Die genauen Bestandteile finden sich im Katalog der Firma.

Herstellung des Rohmediums:

Ein Ein-Liter Becherglas mit Pulver aus dem Mediumbeutel füllen, zu drei Vierteln mit aqua dest. aufgießen. Auf einem Magnetrührer 2g NaHCO_3 einrühren, solange bis sich alles Medium und das Natriumbikarbonat gelöst hat. Lösung mit 1 N Salzsäure auf pH 7,2 titrieren. Lösung in einen geschliffenen Meßkolben (1 Liter) geben und mit aqua dest. auf genau ein Liter auffüllen. Unter dem Laminarflow (CEAG Shirp Reinraumtechnik) wurde das Medium mittels Druckluft durch einen Sterilfilter (Seitz Filter 300ml; Seitz Filterschichten Sorte EKS, Größe 6) in sterile 500ml Glasflaschen mit Schraubverschluß geblasen. Anschließend pH Kontrolle, der sich in einem Bereich von 7,4-7,45 bewegen muß.

Herstellung des Kulturmediums:

500ml Rohmedium RPMI 1640 (wie eben hergestellt)

+ 5ml Vitaminlösung (Gibco Biocult MEM vitamin solution
100x Cat. No. 112)

+ 5ml Antibiotic Antimycotic solution (Gibco)

+ 5ml non essential amino acids (MEM Gibco Europe 100x
Cat. No. 114)

+ 10ml Hepes Puffer (Gibco Europe 1M, pH 7,3)

Ein Medium dieser Zusammensetzung wird im Text als VOLLMEDIUM geführt.

Zugabe von 50ml humanem AB Serum (Gibco Laboratories Formula 79-0279) führt das Medium in das KULTURMEDIUM über.

Hanks balanced salt solution

Wurde als flüssiges Medium fertig bezogen (Gibco).

Enthält anorganische Salze, Glukose und Phenolrot.

Genaue Zusammensetzung im Katalog der Firma aufgeführt.

Waschlösung:

500ml Hanks balanced salt solution

+ 5ml Antibiotic Antimycotic solution

+ 10ml Hepes Puffer

IV.1.2. ZUSÄTZE ZU DEN MEDIEN; KULTURZUSÄTZE; REAGENTIEN

Vitaminlösung (Gibco Biocult MEM vitamin solution
100x Cat. No. 112)

Genaue Zusammensetzung im Katalog der Firma.

Non Essential Amino Acids (MEM Gibco Europe, 100x
Cat. No. 114)

Genaue Zusammensetzung im Katalog der Firma.

Antibiotic Antimycotic Solution (Gibco)

enthält: - 10 000 Units Penicillin/ml

- 10 000 mikrogramm Streptomycin/ml

- 25 mikrogramm Fungizone/ml

in physiologischer Kochsalzlösung.

Hepes Puffer (Gibco Europe 1M, pH 7,3)

AB Serum: Gibco Laboratories Formula 79-0279

mit Ria auf HBsAg getestet: nonreactive

PHA-M

(Fa. Bacto)

Herstellung der Lösung:

5mg Trockensubstanz mit 5ml aqua dest. auflösen und mit Vollmedium auf 50ml auffüllen. Zugabe von 0,1ml per ml Zellkultur mit 10^6 Zellen. Einwirkzeit 42-60 Stunden.

BE Lösungen

- zur Attackerstimulation: 1mg/ml in Kulturmedium
50 Mikrogramm per 10^6 Zellen
- zur Target Markierung: 1mg/ml in Vollmedium
1mg per 10^7 Zellen

TRP-BE Lösungen

das selbe Schema wie für BE Lösungen

2-hydroxy-5-nitrobenzylbromid

(Sigma Chemie Nr. H 3877)

Ficoll, Dichte 1077

Thilo Arzneimittel Sauerlach

Triton X100

5%ige Lösung mit Aqua dest. herstellen

IV.1.3. Lösungen und Geräte zu den Markierungsansätzen

VORVERSUCHE

H3 Markierung:

H3 Lösung (Amersham Buchler 1mCi/ml) 1:2,5 mit Vollmedium verdünnt

Erntegerät Mash II (Dynatech)

Filterstreifen: H3 Glass Fiber Filter 934

AH 11/2" x 12" Whatman INC New Jersey

Szintillationsröhrchen für H3 (Dynatech)

Szintillationsflüssigkeit: rotiszint 11 = 1 Liter Toluol
+ 6g PPO; + 10mg POPOP
(Carl Roth KG Karlsruhe)

Szintillationspipettiermaschine: Gilson mini MTDC
und Distrigil V
Szintillationscounter: Packard Tri Carb Liquid
Scintillation Spectrometer

HAUPTVERSUCHE

Chrommarkierung:

Natriumchromat Cr51 in physiologischer Kochsalzlösung
1mCi in 2ml physiologischer NaCl
Behring Werke, Kat. No. Cr 101, Marburg
100 mikroCurie pro 10^7 Zellen

Markierungsröhrchen: Polypropylen, Greiner Nr. 124261

Mikroreaktionsgefäße: Greiner Nr. 617301

Zwölfkanalpipette: Titertek, Fa. Flow Laboratories

Gammacounter: Auto Gamma Scintillation Spectrometer
Fa. Packard

Klicker: 20 mikroliter Steristep, Fa. Interchem

Für Vor- und Hauptversuche gemeinsam verwendete Materialien:

Aufbewahrungsröhrchen für Lösungen (Polystyrol)
Greiner Nr. 163277

Ficollgradientenzentrifugationsröhrchen (Polypropylen)
Greiner Nr. 187261

Zentrifugationsgefäße für Waschungen: Plastic Conical
Tube with Plastik Screw Cap, 50ml
Fa. Falcon, steril

Kulturflaschen: Falcon TM 25 cm² (50ml) mit Schraubverschluß,
Fa. Falcon Nr. 3013

Mikrotiterplatten: Nuncion Delta, Nunc intermed
Denmark, (U-bottom)

sterile Einmalspritzen:

- Tuberkulinspritzen Plastipak B-D
(1ml), Plastipak Ireland
- 5ml / 10ml / 20ml Luer Spritzen
Plastipak
- 50ml Perfusorspritzen Braun Mels.

Kanülen: - Sterikan B. Braun Melsungen Gr.1
- weiße Flügelkanüle Venofix Braun Melsungen
Luer 1,1-G19

Pipettiermaschine: Pipet aid, Hush II TM; Metaframe
living world; Canada, Toronto

Klicker: 20 mikroliter Steri Step, Fa. Interchem

Pipetten: 5ml / 10ml/ 1ml serological, Einmalpipetten
Becton und Dickinson

Zentrifuge: Hettich Rotata K, (6000 U/min = 400g)

Sterilisationsgeräte und Zubehör:

- Seitz Filter 300ml
- Filtereinsätze: Seitz Filterschichten
Sorte EKS/6
- Minifilter: Gelman Acrodisc 0,2 und 1,2
mikrometer, No. 4192 und 4190
- Großraumsterilisator: Getinge-Verken
plusmatic (Halmstad)

Pipettierzubehör:

- Eppendorf Standardtips Pipettenspitzen
- Pasteurpipetten DRTM 810/PP 145mm
John Poulton Ltd. Essex UK.

Wobbler: ika Vibro Fix; 1/sec, 1mm Ausschlag

Brutschrank: Heräus Typ 8/5060 EK/002, Hanau

Laminarflow: CEAG Shiro Reinraumtechnik

- Modell Enviroco CF 400B

IV.1.4. Tabelle XVIII: Der Fog Score (94)

Grundlage für die klinische Evaluation der neurologischen Defizite und ihre Standardisierung in der Zahl des Fog Score.

DISABILITY	SCORE
1. Cranial nerves:	
- lowered vision of one eye	1
- severe disturbance in vision of one eye	2
- nystagmus at lateral gaze (one for left and one for right side)	1
- discoordination of eye movements (1+1)	2
- nystagmus spontanea (1+1)	2
- paresis of facial nerve	1
- hypoesthesia of trigeminal nerve	1
- neurogenic hearing disturbances	1
- Dysarthria (1+1)	2
2. The upper extremity	
- disturbance in skilled movements of fingers	1
- dysdiadokokinesis	1
- dysmetria	1
- tremor at finger-nose-test	1
- paresis of extension of elbow and hand (slight)	1
- paresis of extension of elbow and hand (moderate)	2
- paresis of extension of elbow and hand (severe)	3
3. The lower extremity	
- Babinski's sign	1
- hyperreflexia	1
- hypotonia	1
- hypertonia	1
- dysmetria	1
- tremor at knee-heel-test	1

DISABILITY	SCORE
- walking with one stick	1+1
- walking with two sticks	2+2
- walking supported by one person	3+3
- atactic gait	1+1

Paresis:

hip: elevation of leg, with knee stretched, degree from the horizontal plane:

- 0°	5
- 10° - 30°	4
- 31° - 59°	3
- 60° - 89°	2
- 90° - 110°	1

if a paresis is present

knee-flexion:

- from 180° - 45°	1
- from 180° - 45° - 30°	2
- from 180° - 30° - 1°	3
- 0°	4

dorsiflexion of the ankle joint:

the angle from the horizontal plane is registered:

- more than 90° (if a paresis is present)	1
- from 60° - 90°	2
- below 60°	3
- 0°	4

4. Sensory system:

hypaesthesia: hand	1
antebrachium	1
crus	1
femur	1
- lower leg up to TH.10	3
- lower leg up to TH. 4	4
- loss of vibration sense: foot 1; Knee 1; hip1	
- loss of position sense (upper/lower body)	1

V. LITERATURVERZEICHNIS

- 1 Adams, C.W.M.
Pathology of MS: progression of the lesion.
Br. Med. Bull. 33:15-20, 1977
- 2 Adams, C.W.M., Hallpike, J.F., & Bayliss, O.B.
Histochemistry of myelin.XIII. Digestion of basic
protein outside acute plaques of multiple sclerosis.
Journal of Neurochemistry, 18: 1479-1483, 1971
- 3 Adams, R.D. & Kubik, C.S.
The morbid anatomy of the demyelinating diseases.
Amer. J. Med. 12:510-546, 1952
- 4 Allen, J.C., Sheremata, W., Cosgrove, J.B.R., Oster-
land, K., & Shea, M.
Cerebrospinal fluid T and B lymphocyte kinetics rela-
ted to exacerbations of MS.
Neurology 26:579-583, 1976
- 5 Alter, B.J., Schendel, D.J., Bach, M.L., Klein, J.
& Stimpfling J.H.
Cell-mediated lympholysis. Importance of serologically
defined H-2 regions.
J. Exp. Med. 137: 1303-1309, 1973
- 6 Alvord, E.C., Jr.,
The ethiology and pathogenesis of EAE.
in Bailey, O.T., Smith, D.E., (eds.):
The central nervous system.
Baltimore, The Williams and Wilkins Co. pp 52-70
1968
- 7 Alvord, E.C., Jr.,
Acute disseminated encephalomyelitis and "allergic"
neuroencephalopathies.
in : Vinken, P.J., Bruyn, G.W., (eds.):
Handbook of Clinical Neurology.
North-Holland, Amsterdam, pp 500-571, 1970
- 8 Alvord, E.C., Hraby, S., Petersen, R., & Kies, M.W.
An analysis of antigenic determinants within MBP.
in: Shiraki, H., Yonezawa, T., Kuroiwa, H., (eds.)
The ethiology and pathogenesis of the demyelinating
diseases.
Japan Science press, Tokyo, pp 217-226, 1976

- 9 Alvord , E. C., Jr., Hruby, S., Sires, L.R.
Degradation of MBP by cerebrospinal fluid:
Preservation of Antigenic Determinants under Physio-
logic Conditions.
Laboratory of Neuropathology, University of Washing-
ton, Medical School , Seattle,
Washington 98195, in press: pp 1-29
- 10 Alvord, E.C., Jr., Hsu, P.C., Thron, R.
Leukocyte Sensitivity to Brain Fractions in
Neurological Diseases.
Arch. Neurol. Vol. 30, pp 296-299, 1974
- 11 Antel, J.P., Richman, D.P., Medof, M.E., Arnason, B.G.
Lymphocyte function and the role of regulator cells
in Multiple Sklerosis.
Neurology 28 (2) pp . 106-110, 1978
- 12 Ballas, Z.K., & Henney, Ch. S.,
Generation of H2 restricted cytotoxic T cells by TNT
proteins in vitro: specificity and requirements.
J. Immunol. 123: 1696-1704, 1979
- 13 Barman, T.E., & Koshland, D.E., Jr.,
A colorimetric procedure for the quantitative deter-
minations of tryptophan residues in proteins.
J. Biol. Chem. 242: 5771-79, 1967
- 14 Bartfeld, H., & Atoynatan, T.,
In vitro delayed (cellular) hypersensitivity in
multiple sklerosis to central nervous system antigens.
Int. Arch. Allergy Appl. Immunol. 39:361 , 1970
- 15 Bartfeld, H., & Atoynatan, T.,
Lymphocyte transformation in MS.
Brit. med. J. II:63 Jahrgang 1970
- 16 Bartfeld, H., Atoynatan, T., Donnenfeld, H.,
In vitro cellular immunity to nervous system antigens
in: MS: Immunology, virology and ultrastructure.
Wolfram, F., Ellison, G.W., Stevens, J.A., et al.
(eds.) New York, Academic Press pp 333-364, 1972
- 17 Bauer, H.J., Poser, S., Ritter, G., (Herausgeber)
Progress in Multiple Sklerosis Research.
Springer Verlag Berlin, Heidelberg, New York, 1980

- 17 Seitenangaben an den relevanten Stellen im Text.
- 18 Beer, M., von Specht, B.U., Permanetter, W., Brendel, W.,: Direct proof of autoreactive T-lymphocytes in experimental allergic encephalomyelitis (EAE). Acta Neuropathol (Berl) Suppl. VII, pp 169-172, Springer Verlag, 1981
- 19 Beer, M., & Specht, B.U. von, unveröffentlichte Ergebnisse
- 20 Behan, P.O., Geschwind, N., Lamarche, J.B., Lisak, R.P., Kies, M.W., Delayed type hypersensitivity to encephalitogenic protein in disseminated encephalomyelitis. Lancet II: 1009, 1968
- 21 Benacerraf, mündliche Mitteilung auf dem Kongress für Immunologie in Luzern 1981
- 22 Benuck, M., Marks, N., Hashim, G.A., Metabolic instability of myelin proteins, breakdown of basic protein induced by brain cathepsin D. Europ. J. Biochem. 52: 615-621, 1975
- 23 Ben-Nun, A., Otmay, H., Cohen, I.R., Genetic control of autoimmune encephalomyelitis and recognition of a critical nonapeptide moiety of myelin basic protein in guinea pigs are exerted through interaction of lymphocytes and macrophages. Eur. J. Immunol. 11: 311-316, 1981
- 24 Bergstrand, H., Immunochemistry of Encephalitogenic Protein in: Atassi, M.Z., (ed): Immunochemistry of proteins. Vol. 1. pp 315-370, Plenum Press 1977
- 25 Bergstrand, H., & Källen, B., Transformation of rabbit blood leucocytes with a bovine encephalitogen temporal pattern of reactivity. Acta Pathol. Microbiol. Scand. Sect. B 79: 551, 1971
- 26 Bergstrand, H., & Källén, B., Localisation of antigenic determinants on bovine encephalitogenic proteins. Studies in guinea pigs with MI. Cell. Immunol. 3: 660-671, 1972

- 27 Berke, G., Ax, W., Ginsburg, H., Feldman, M.,
Graft rejection in tissue culture. II. Quantification of the lytic action on mouse fibroblasts by rat lymphocytes sensitized on mouse embryo monolayers.
Immunology 16: 643, 1969
- 28 Berke, G., & Gabison, D.,
Energy requirements of the binding analytic steps of T cell-mediated cytotoxicity of leucemic cells in vitro.
Eur. J. Immunol. 5: 671, 1975
- 29 Berke, G., Sullivan, K.A., Amos, B.,
Rejection of ascites tumor allograft. I. Isolation, characterisation and in vitro reactivity of peritoneal lymphoid effector cells from BALB/c immune mice to EL4 leucosis.
J. Exp. Med. 135: 1334, 1972
- 30 Berke, G., Yagil, G., Ginsburg, H., Feldman, M.,
Kinetic analysis of a graft reaction in cell culture.
Immunology 17: 723-740, 1969
- 31 Biberfeld, P., & Johansson, A.,
Contact areas of cytotoxic lymphocytes and target cells: An electron microscopic study.
Exp. Cell Res. 94: 79, 1975
- 32 Boyum, A.,
Isolation of lymphocytes, granulocytes and macrophages.
Scand. J. Immunol. Vol. 5, Suppl. 5, 9 - 15, 1976
- 33 Brockman, J.A., Stiffey, A.V., Tesar, W.C.,
An vitro assay for encephalitogen components of CNS tissue.
J. Immunol. 100: 1230, 1968
- 34 Brockman, J.A., Stiffey, A.V.,
Multiple sclerosis: Lymphocyte transformation by basic protein from bovine spinal cord.
Experientia (Basel) 26: 413-414, 1970
- 35 Brody, J.M., Harlem, M.M., Kurtzke, J.F., White, L.R.,
Unsuccessful attempt to induce transformation by cerebrospinal fluid in cultured lymphocytes from patients with MS.
New Engl. J. Med. 279: 202, 1968

- 36 Brosnan, C.F., Cammer, W., Norton, W.T., Bloom, B.R.,
The role of activated macrophages in inflammatory demyelinating diseases.
Abstract 18. 6. 05. Kongress für Immunologie
Paris 1980, (Abstractband)
- 37 Brostoff, S., & Eylar, E.H.,
Localisation of methylated arginin
in the A1 protein from myelin.
Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., 68: 765-769, 1971
- 38 Brostoff, S.W., Rentes, W., Hichens, M., Eylar, E.H.,
Specific cleavage of the A1 protein from myelin with
cathepsin D.
J. Biol. Chem. 249: 559-567, 1974
- 39 Brunner, K.T., Mauel, L., Cerottini, J.-C., Chapuis, B.,
Quantitative assay for the lytic action of immune lymphoid cells on 51 Chromium labelled allogeneic target cells in vitro: Inhibition by isoantibody and by drugs.
Immunology 14: 181-196, 1968
- 40 Buletza, G.F., Jr., & Smith, M.E.,
Enzymic hydrolysis of MBP and other proteins in central nervous system and lymphoid tissues from normal and demyelinating rats.
Biochem. J. 156: 627-633, 1976
- 41 Campbell, B., Vogel, P.J., Fisher, E., Lorenz, R.,
Myelin basic protein administration in MS.
Arch. Neurol. 29: 10-15, 1973
- 42 Carnegie, P.R.,
Amino acid sequence of the encephalitogenic basic protein from human myelin.
Biochem. J. 123: 57-67, 1971
- 43 Carnegie, P.R.,
Properties, structure and possible neuroreceptor role of the encephalitogenic protein of human brain.
Nature 229: 25-28, 1971
- 44 Carnegie, P.R., Bencina, B., Lamoureux, G.,
Experimental allergic encephalomyelitis: isolation of basic proteins and polypeptides from central nervous

- tissue.
- Biochem. J. 105: 559-568, 1967
- 45 Caron, G.A.,
Lymphocyte transformation in MS.
New. Engl. J. Med. 276: 699-700, 1967
- 46 Carson, J.H., Barbarese, E., Braun, P.E., McPherson,
T.A., Components in MS CSF that are detected by RIA
for MBP.
Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 75: 1976-1978, 1978
- 47 Carter, B.B., Jackson, D.F., Kolber, A.R.,
Observation on the attachment of Chromium 51 to the
human red cell.
Internat. J. Appl. Radiation Isotopes 18: 615-618,
1967
- 48 Caspary, E.A., & Field, E.J.,
Specific lymphocyte sensitisation in cancer: is there
a common antigen in human malignant neoplasia.
Br. Med. J. 2: 613-617, 1971
- 49 Caspary, E.A., & Field, E.J.,
Lymphocyte sensitisation to basic protein of brain
in multiple sclerosis and other neurological diseases.
J. Neurology, Neurosurgery and Psychiatry 37: 701-
703, 1974
- 50 Cerottini, J.-C., & Brunner, K.T.,
Cell mediated cytotoxic allograft rejection and tumor
immunity.
Adv. Immunol. 18: 67-132, 1974
- 51 Cerottini, J.-C., Engers, H.D., MacDonald, H.R.,
Brunner, K.T.,
Generation of cytotoxic T lymphocytes in vitro.
I. Response of normal and immune mouse spleen cells
in mixed lymphocyte cultures.
J. Exp. Med. 140: 703-717, 1974
- 52 Cerottini, J.-C., Nordin, A.A., Brunner, K.T.,
In vitro cytotoxic activity of thymus cells sensi-
tized to alloantigens.
Nature (London) 227: 72-73, 1970

- 53 Cerottini, J.-C., Nordin, A.A., Brunner, K.T.,
Specific in vitro cytotoxicity to thymus derived
lymphocytes sensitized to alloantigens.
Nature (London) 228: 1308-1309, 1970
- 54 Clement, L.T., & Shevach, E.M.,
Characterisation of MHC Antigens on TNP modified
cells.
Molecul. Immunol. 16: 67-76, 1979
- 55 Coates, A.S., & Lennon, V.A.,
Lymphocytes binding basic protein of myelin; Cyto-
phylic serum antibody and effect of adjuvant.
Immunology 24: 425-434, 1973
- 56 Cohen, S.R., Brune, M.J., Herndon, R.M., McKhann,
G.M.,: Cerebrospinal fluid myelin basic protein and
multiple sclerosis.
in: Palo, J., (ed.): Myelination and demyelination.
Plenum Publishing Corporation, pp 513- 519, 1978
- 57 Cohen, S.R., Herndon, R.M., McKhann, G.M.,
Radioimmunoassay of myelin basic protein in spinal
fluid. An index of active demyelination.
New Engl. J. Med. 295: 1455-1457, 1976
- 58 Cohen, S.R., McKhann, G.M., Guarnieri, M.,
A radioimmunoassay for myelin basic protein and its
use for quantitative measurements.
J. Neurochem. 25: 371-376, 1975
- 59 Cohen, S.R., Herndon, R.M., McKhann, G.M.,
RIA of MBP, an index of active demyelination.
New. Engl. J. Med. 295: 1455-1457, 1976
- 60 Colby, S., Sheremata, W., Bain, B., Eylar, E.,
Cellular hypersensitivity in attacks of multiple
sclerosis. I. A comparative study of migration inhi-
bitory factor production and lymphoblastic transfor-
mation in response to myelin basic protein.
Neurology, Minneap. 27: 132-139, 1977
- 61 Cuzner, M.L., Davison, A.N., Rudge, P.,
Proteolytic enzyme activity of blood leukocytes and
CSF in MS.
Ann. Neurol. 4: 337-344, 1978

- 62 Cuzner, M.L., McDonald, W.I., Rudge, P., Smith, M.,
Borsell, N., Davison, A.N.,
Leucocyte proteinase activity and acute MS.
J. Neurol. Sci. 26: 107-111, 1975
- 63 Cuzner, M.L., Richards, P.T.,
Proteolytic activity of the CSF and CNS.
International Society for Neurochemistry, Helsinki,
pp 29-31, August 1977
- 64 Dau, P.C., & Peterson, R.D.A.,
Transformation of rodent lymphoid cells by an encephalitogen of human origin.
Int. Arch. Allergy 35: 353-368, 1969
- 65 Dau, P.C., Peterson, R.D.A.,
Transformation of lymphocytes from patients with
multiple sclerosis.
Arch. Neurol. (Chic.) 23: 32-40, 1970
- 66 David, J.P., & Paterson, P.Y.,
In vitro demonstration of cellular sensitivity in
experimental allergic encephalomyelitis.
J. Exp. Med. 122: 1161-1171, 1965
- 67 Davis, L., Hersh, E.M., Curtis, J.E., Lynch, R.E.,
Ziegler, D.K., Neumann, J.W., Chin, T.D.Y.,
Immune status of patients with multiple sclerosis.
Neurology (Minneap.) 22: 989-997, 1972
- 68 Davis, L., Hersh, E.M., Curtis, J.E.,
Immune status of patients with multiple sclerosis.
Neurology 22: 989-997, 1972
- 69 Davison, A.N., Humphrey, J.H., Liversedge, A.L.,
McDonald, W.I., Porterfield, J.S., (eds.):
Multiple Sclerosis Research
Her Majesty's Stationary Office
Elsevier Scientific Publishing Company, Amsterdam
New York, 1975
Seitenangaben an den jeweiligen Stellen im Text.
- 70 Dawson, J.W.,
The histology of MS.
Roy. Soc. Edin. 50: 517, 1916
- 71 Dickinson, J.P., Jones, K.M., Aparicio, S.R., Lumsden,

Localisation of encephalitogenic basic protein in the intraperiod line of lamellar myelin.

Nature (London) 227: 1133-1134, 1970

- 72 Doherty, P.C., & Zinkernagel, R.M.,
T-cell mediated immunopathology in viral infections.
Transplant. Rev. 19: 89-120, 1974
- 73 Dore-Duffy, P., Goertz, V., Rothman, B.L.,
Lymphocyte adherence to myelinated tissue in MS.
J. Clin. Invest. 66, No. 4: 843-846, 1980
- 74 Dore-Duffy, P., Zurier, R.B., Donaldson, J., Nystrom, J.S., Viola, M.V., Rothman, B., Thompson, G.H.,
Lymphocyte adherence in MS.
Neurology 29: 232-235, 1979
- 75 Driscoll, B.F., Kies, M.W., Alvord, E.J.,
Successful treatment of EAE in guinea pigs with homologous myelin basic protein.
J. Immunol. 112: 392-397, 1974
- 76 Driscoll, B.F., Kies, M.W.,
Specific antigenic sites of myelin basic protein.
Fed. Proc. 36: 1298-1305, 1977
- 77 Driscoll, B.F., Kies, M.W., Alvord, E.J., Jr.,
Protection against EAE with peptides derived from MBP: Presence of intact encephalitogenic site is essential.
J. Immunol. 117: 110-114, 1976
- 78 Driscoll, B.F., Kramer, A.J., Kies, M.W.,
MBP: Location of multiple independent antigenic regions.
Science 184: 73-75, 1974
- 79 Dupouey, P., Jacque, C., Bourre, M., Cesselin, F., Privat, A., Baumann, N.,
Immunochemical studies of MBP in Shiverer mouse, devoid of major dense line of myelin.
Neurosci. lett. 12: 113-118, 1979
- 80 Eder, M., & Gedigk, P., (Herausgeber)
Lehrbuch der allgemeinen Pathologie und der pathologischen Anatomie. (Seitenangaben im Text)
Springer Verlag, Berlin, Heidelberg, New York, 1975

- 81 Eng, L.F., Chao, F.-C., Gerstl, B., Pratt, D.,
Tavaststjerna, M.G.,
The maturation of human white matter myelin. Fractionation of the myelin membrane proteins.
Biochemistry 7: 4455-4465, 1968
- 82 Engers, H.D., & MacDonald, H.R.,
Generation of cytolytic T lymphocytes in vitro.
Department of Immunology, Swiss Institute for experimental Cancer Research
1011 Lausanne, Switzerland
- 83 Epand, R.M., Moscarello, M.A., Zierenberg, B.,
Vail, W.J.,
The folded confirmation of the encephalitogenic protein of the human brain.
Biochemistry 13: 1264-1267, 1974
- 84 Epstein, S.L., Ozato, K., Sachs, D.H.,
Blocking of allogeneic cell-mediated lympholysis by monoclonal antibodies to H-2 antigens.
J. Immunol. 125: 129-135, 1980
- 85 Eylar, E.H.,
Amino acid sequence of the myelin basic protein.
Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 67: 1425, 1970
- 86 Eylar, E.H.,
Basic A1 protein of myelin: Relationship to EAE.
in: Rowland, P., (ed.) . Immunological disorders of the nervous system.
Williams and Wilkins, Baltimore, pp. 50-75, 1971
- 87 Eylar, E.H.,
The structure a. immunologic properties of MBP's.
Ann. N.Y. Acad. Sci. 195: 481-491, 1972
- 88 Eylar, E.H., Caccam, J., Jackson, J.J., Westall, F.C.,
Robinson, A.B.,
EAE: Synthesis of disease inducing site of basic protein.
Science 168: 1220-1223, 1970

- 89 Eylar, E.H., Hashim, G.A.,
EAE: Cleavage o. t. C-tryptophyl bond in bovine MBP.
Archives of Biochemistry and Biophysics 131: 215-222
1969
- 90 Eylar, E.H., Jackson, J., Rothenberg, B., Brostoff,
S.W., Suppression of the immune response: Reversal of
the disease state with antigen in EAE.
Nature (London) 236: 74-76, 1972
- 91 Eylar, E.H., Salk, J., Beveridge, G.C., Brown, L.V.,
EAE: An encephalitogenic basic protein from bovine
myelin.
Arch. Biochem. Biophys. 132: 34-48, 1969
- 92 Eylar, E.H., & Thompson, M.,
EAE: The Physicochemical properties of the basic
encephalitogen from bovine spinal cord.
Arch. Biochem. Biophys. 129, 468-479, 1969
- 93 Field, E.J., Green, C.A., Miller, M.,
Response of normal and MS subjects to typhoid- para-
typhoid vaccine injections.
J. Neurol. Neurosurg. Psychiat. 24: 78-79, 1961
- 94 Fog, T.,
A scoring system for neurological impairment in MS.
Acta Scand. Neurol. 41, Suppl. 13: 551-555, 1965
- 95 Fowler, I., Morris, C.E., Whitley, T.,
Lymphocyte transformation in MS induced by cerebro-
spinal fluid.
New Engl. J. Med. 275: 1041-1044, 1966
- 96 Frick, E., Stickl, H., Zinn, K.H.,
Lymphozytentransformation bei multipler Sklerose.
Nachweis einer Sensibilisierung gegen basisches
Myelinscheidenprotein.
Klin. Wsch. 52, 238-245, 1974
- 97 Frick, E., Stickl, H.,
Antibody-dependent lymphocyte cytotoxicity against
basic protein of myelin in multiple sclerosis.
J. Neurol. Sci. 46: 187-197, 1980
- 98 Friede, R.L.,
Enzyme histochemical studies in MS.

- Arch. Neurol. 5: 433-443, 1961
- 99 Gardner, I.D., Bownern, N.A., Blanden, R.V.,
Cell mediated cytotoxicity against ektromelia virus-
infected target cells. III. Role of the H2 gene
complex.
Eur. J. Immunol. 5: 122-128, 1975
- 100 Gerstl, B., Eng, L.F., Tavaststjerna, M., Smith, J.
K., Kruse, S.L.,
Lipids and proteins in multiple sclerosis white
matter.
J. Neurochem. 17: 677-689, 1970
- 101 Golstein, P.,
Sensitivity of cytotoxic cells to T cell-mediated
cytotoxicity.
Nature (London) 252: 81-82, 1974
- 102 Gonsette, R.E., Delmotte, P., Demonty, L.,
Failure of basic protein therapie for MS.
J. Neurol. 216: 110-114, 1977
- 103 Gonzalez-Sastre, F.,
The protein composition of isolated myelin.
J. Neurochem. 17: 1049-1056, 1970
- 104 Gosseye-Lissoir, F., Delmotte, P., Carton, H.,
Biochemical findings in MS: V.Transformation of
lymphocytes from patients with multiple sclerosis
by human basic protein.
J. Neurol. 216, 197-205, 1977
- 105 Greenfield, J.G., & Norman, R.M.,
Demyelinating diseases.
in: Blackwood, W., McMenemey, W.H., Meyer, A.,
Norman, R.M., Russell, D.S., (eds.):
Greenfield's Neuropathology. Ed.2
London. Edward Arnold Publishers Ltd. p 475
- 106 Guarneri, M., Himmelstein, J., McKhann, G.M.,
Isolated myelin quantitatively absorbs antibody
to basic protein.
Brain Res. 72: 172-176, 1974
- 107 Guseo, A., Jellinger, K.,
The significance of perivascular infiltrations in

- multiple sclerosis.
J. Neurol. 211: 51-60, 1975
- 108 Gutstein, McKhann, G.M., Cohen, S.R.,
A comparison of CSF in MS and EAE.
J. Neuropath. Exp. Neurol. 36: 604-610, 1977
- 109 Hämmerling, G.J., Conai, P., McDevitt, H.O.,
Specificity and temperature requirements for T cell
interaction with an antigen. pp 121-126
in: Seligman, L.M., Prend'homme, J.J., Kourilsky,
F.M., (eds.):
Membrane receptors of lymphocytes.
North Holland Publishing Co. Amsterdam, 1975
- 110 Hashem, N., Barr, M.L.,
Mitogenic effects of rabies vaccine on cultures of
lymphocytes in diseases of the nervous system.
Lancet 2: 1029-1030, 1963
- 111 Hashim, G.A.,
EAE: Activation of suppressor T lymphocytes by a
modified sequence of the T effector determinant.
J. Immunol. 128: 419- 423, 1981
- 112 Hashim, G.A.,
MBP: Structure, Function and Antigenic Determinants.
Immunological Review 39: 61-108, 1978
- 113 Hashim, G.A., & Eylar, E.H.,
EAE: Enzymatic degradation of the encephalitogenic
basic protein from bovine spinal cord.
Arch. Biochem. Biophys. 129: 635-644, 1969
- 114 Hashim, G.A., & Eylar, E.H.,
The structure of the terminal regions of the
encephalitogenic basic protein from bovine myelin.
Arch. Biochem. Biophys. 135: 324-333, 1969
- 115 Hashim, G.A., Lee, D.H., Pierce, J.C., Braun, C.W.,
Fitzpatrick, H.F.,
Myelin basic protein stimulated rosette forming T
cells in multiple sclerosis.
Neurochemical Research 3: 37 - 48 , 1977
- 116 Hashim, G.A., & Shilling, F.J.,
Prevention of EAE by nonencephalitogenic basic

- peptides.
Arch. Biochem. Biophys. 156: 287-297, 1973
- 117 Henney, C.S.,
Quantitation of the cell mediated immune response.
I. The number of cytolytically active mouse lymphoid
cells induced by immunisation with allogeneic
mastocytoma cells.
J. Immunol. 107: 1558-1566, 1971
- 118 Henney, C.S.,
Studies on the mechanism of lymphocyte mediated
cytolysis. II. The use of various target cell mar-
kers to study cytolytic events.
J. Immunol. 110: 73-84, 1973
- 119 Henney, C.S.,
Examination of the size of a T cell induced lytic
lesion. Nature (London) 249: 456-457, 1974
- 120 Henney, C.S.,
T-cell mediated cytolysis: An overview of some
current issues. pp. 245- 272
Communication No. 253, O'Neill Memorial Research
Laboratories, Good Samaritan Hospital,
Baltimore, Maryland.
- 121 Henney, C.S., Bubbers, J.E.,
Studies on the mechanism of lymphocyte mediated
cytolysis. I. The role of divalent cations in cyto-
lysis by T-lymphocytes.
J. Immunol. 110: 63-72 , 1973
- 122 Henney, C.S., & Lichtenstein, L.M.,
The role of cAMP in the cytolytic activities
of lymphocytes.
J. Immunol. 107: 610-612, 1971
- 123 Henney, C.S., & Mayer, M.M.,
Specific cytolytic activity of lymphocytes.
Effect of antibodies against complement components
C2, C3 and C5.
Cell. Immunol. 2: 702-710, 1971
- 124 Herndon, R.M., & Johnson, M.,
A method for the electron microscopic study of

- cerebrospinal fluid sediment.
J. Neuropathol. Exp. Neurol. 29:320-329, 1970
- 125 Herndon, R.M., Rauch, H.C., Einstein, E.R.,
Immuno-electron microscopic localisation of the
encephalitogenic basic protein in myelin.
Immunol. Commun. 2: 163-172, 1973
- 126 Hertel-Wulff, B., & Rubin, B.,
Lymphocyte proliferation in vitro induced by soluble
protein antigens.
Eur. J. Immunol. 6: 418-424, 1976
- 127 Hirshfeld, H., Teitelbaum, D., Arnon, R., Sela, M.,
Basic encephalitogenic protein: simplified purification on sulfoethyl-sephadex.
FEBS letters 7: 317-320, 1970
- 128 Hirshhorn, K.,
Discussion of lymphocyte transformation.
Fed. Proc. 27: 31-32, 1968
- 129 Horton, H.R., & Koshland, D.E., Jr.,
A highly reactive coloured reagent with selectivity
for the tryptophan residue in proteins:
2-hydroxy-5-nitrobenzylbromide.
J. Am. Chem. Soc. 87: 1126-1132, 1964
- 130 Huddleston, J.R., & Oldstone, M.B.A.,
T suppressor (T_G) lymphocytes fluctuate in parallel
with changes in the clinical course of patients with
multiple sclerosis.
J. Immunol. 123: 1615-1618, 1979
- 131 Hughes, D., & Caspary, E.A.,
Lymphocyte transformation in vitro measured by
tritiated thymidine uptake. I. Lymphocyte culture
techniques.
Int. Arch. Allergy 37: 506-531, 1970
- 132 Hughes, D., Caspary, E.A., Field, E.J.,
Lymphocyte transformation induced by encephalitogenic factor in MS and other neurological diseases.
Lancet : 1205-1207, 1968
- 133 Hughes, D., Caspary, E.A., Field, E.J.,
Delayed hypersensitivity studies in EAE. A comparison

- son of macrophage migration inhibition tests and electrophoretic mobility.
Z. Immun. Allergieforschung 141: 14-19, 1970
- 134 Hughes, D., & Field, E.J.,
Inhibition of macrophage migration in vitro by brain and encephalitogenic factor in EAE.
Int. Arch. Allergy 33: 45-58, 1968
- 135 Hughes, D., & Newman, S.E.,
Lymphocyte sensitivity to encephalitogenic factor in guinea pigs with EAE as shown by in vitro inhibition of macrophage migration.
Int. Arch. Allergy 34: 237-256, 1968
- 136 Ibrahim, M.Z.M.,
The mast cells of the mammalian central nervous system. Part1: Morphology, distribution and histochemistry.
J. Neurol. Sci. 21: 431-478, 1974
- 137 Ibrahim, M.Z.M., & Adams, C.W.M.,
The relationship between enzyme activity and neuroglia in plaques of MS.
J. Neurol. Neurosurg. Psychiat. 26: 101-110, 1963
- 138 Jackson, J.J., Brostoff, S.W., Lampert, P., Eylar, E.H., Allergic encephalomyelitis in monkeys induced with A1 protein.
Neurobiology 2: 83-88, 1972
- 139 Jensen, M.K.,
Lymphocyte transformation in multiple sclerosis.
Acta neurol. scand. 44: 200-206, 1968
- 140 Johnson, R.T., & Miller, H.,
Dermal sensitivity tests in MS.
J. Neurol. Neurosurg. Psychiat. 26: 151-153, 1963
- 141 Kabat, E.A., Wolf, A., Berger, A.E.,
Studies on acute disseminated encephalomyelitis produced experimentally in rhesus monkeys. III.
J. Exp. Med. 88: 417-426, 1948
- 142 Källeń, B., & Nilsson, O.,
Effects of cerebrospinal fluid on cultured blood leukocytes from patients with multiple sclerosis.

- Acta neurol. scand. 47: 151-162, 1971
- 143 Kam-Hansen, S.,
Active T cells in blood and CSF in MS and controls.
in: Karcher, D., Lowenthal, A., Strosberg, A.D.,
Humoral immunity in neurological diseases
Plenum Publishing Corporation, 1979, pp 507-509.
- 144 Kam-Hansen, S., Frydeń, A., Link, H.,
B and T cells in cerebrospinal fluid and blood in
MS and acute mumps meningitis.
Acta neurol. Scand., in press.
- 145 Kam-Hansen, S., Frydeń, A., Link, H., Möller, E.,
Reduced in vitro response of CSF lymphocytes to
mitogen stimulation in MS.
Manuscript.
- 146 Kies, M.W.,
Immunology of myelin basic protein.
in: Tower, D.B.(ed.) : The nervous system.
Vol. 1, Brady, R.O. 8ed.: The basic neurosciences.
Raven Press, New York, 1975, pp 637-646
- 147 Kies, M.W., Deibler, G.E.,
Proteolytic activity associated with human myelin
basic protein preparations.
Trans. Amer. Soc. Neurochem. 4: 126-136, 1973
- 148 Kornguth, S.E., & Anderson, J.W., Ladinsky, J., et al.
Cellular localisation of rapid RNA and protein
synthesis induced in presensitized lymphocytes in-
duced by a cationic protein from brain.
Exp. Cell Res. 37: 650-661, 1965
- 149 Koszinowsky, U., & Thomssen, R.,
Target cell dependent T cell-mediated lysis of
vaccinia virus infected cells.
Eur. J. Immunol. 5: 245-250, 1975
- 150 Koulischer, L., & Stenuit, J.,
Nouveaux résultats a propos de la croissance "in
vitro" de lymphocytes de malades atteints de sclérose
en plaques.
Acta neurol. belg. 68: 571-580, 1968

- 151 Kuttner, B.J., & Woodruff, J.J.,
Selective adherence of lymphocytes to myelinated
area of rat brain.
J. Immunol. 122: 1666-1671, 1979
- 152 Laatsch, R.H., Kies, M.W., Gordon, S., Alvord, E.C.
Jr.,: The encephalomyelitic activity of myelin iso-
lated by ultracentrifugation.
J. Exp. Med. 115: 777-788, 1962
- 153 Lamoureux, G., Carnegie, P.R., McPherson, T.A.,
Johnston, D.,
EAE: Immunological properties of encephalitogenic
polypeptides and proteins.
Clin. Exp. Immunol. 2: 601-609, 1967
- 154 Lamoureux, G., Carnegie, P.R., McPherson, T.A.,
Mackay, I.R., Bernard, C.,
Mécanisme d'action d'un polypeptide encéphalitogène
dans l'induction de l'encéphalite allergique experi-
mentale.
Ann. Inst. Pasteur Paris, 118: 562-574, 1970
- 155 Lamoureux, G., Giard, N., Jolicoeur, R., Toughlian,
R., Desrosiers, M.,
Immunological features in MS.
Brit. Med. J. 1: 183-186, 1976
- 156 Lamoureux, G., Thibeault, G., Richer, G., Bernard,
C.,: Induction de l'encéphalite allergique experimen-
tale avec des encéphalitogènes humains de synthèse.
Union Med. Can. 101: 674-680, 1972
- 157 Lampert, P.W.
Fine structural changes of myelin sheath in the
central nervous system. in: Bourné, G.H., (ed.):
The structure and function of the nervous system.
New York , Academic Press Inc., Vol.1 p.186
- 158 Lampert, P.W., et al. Figure 8:5 in MS Research.
in Literatur 69 abgedruckt, 1973
- 159 Lassmann, H., Kitz, K., Wisniewski, H.M.,
Structural variability of demyelinating lesions in
different models of subacute and chronic EAE.
Acta Neuropathol. (Berl) Suppl. VII: 173-175, 1981

- 160 Laurell, C.B., Jeppson, J.O.,
Protease inhibitors in plasma.
in: Putnam, F.W., (ed.): The plasma proteins.
Structure, function and genetic control.
New York, Academic press, 2nd edition, Vol.1,
pp. 229-264, 1975
- 161 Lee, A.K.Y., McKay, I.R., Rowley, M.J., Yap, C.Y.,
Measurement of antibody producing capacity to fla-
gellin in man. IV. Studies in autoimmune disease,
allergy and azathioprine treatment.
Clin. exp. Immunol. 9: 507, 1971
- 162 Lennon, V.A., & Carnegie, P.R.,
Immunological responses of guinea pigs to a synthe-
tic autoantigen of brain.
Eur. J. Immunol. 4: 60-62, 1974
- 163 Lennon, V.A., Whittingham, S., Carnegie, P.R.,
McPherson, T., Mackay, I.R.,
Detection of antibodies to the basic protein of
human myelin by RIA and immunofluorescence.
J. Immunol. 107: 56-62, 1971
- 164 Lennon, V.A., Wilks, A.V., Carnegie, P.R.,
Immunologic properties of the main encephalitogenic
peptide from the basic protein of human myelin.
J. Immunol. 105: 1223-1230, 1970
- 165 Levitt, D., Griffin, N.B., Egan, M.L.,
Mitogen-induced plasma cell differentiation in
patients with multiple sclerosis.
J. Immunol. 124: 2117-2121, 1980
- 166 Lisak, P.R., & Behan, P.O.,
Experimental autoimmune demyelinating diseases:
EAE and EAN.
Biomedicine 22: 81-87, 1975
- 167 Lisak, P.R.,
Multiple Sclerosis:
Immunological aspects.
Ann. clin. Lab Sci. 5: 324-329, 1975
- 168 Lisak, P.R., & Levinson, A.I.,
T and B cells in multiple sclerosis

lymphocytes.

- Clin. exp. Immunol. 22: 30-34, 1975
- 169 Lisak, R.P., & Zweiman, B.,
In vitro and in vivo immune responses to homologous
myelin basic protein in EAE.
Cell. Immunol. 11: 212-220, 1974
- 170 Lisak, R.P., Zweiman, B., Kies, M.W., Driscoll, B.,
EAE in resistant and susceptible guinea pigs: In
vivo and in vitro correlates.
J. Immunol. 114: 546- 549, 1975
- 171 London, Y., & Vossenberg, F.G.A.,
Specific interaction of central nervous system
myelin basic protein with lipids. Specific regions
of the protein sequence protected from the proteo-
lytic actions of trypsin.
Biochim. Biophys. Acta. 307: 478-490, 1973
- 172 Lumsden, C.E.,
The neuropathology of MS.
in: Vinken, P.J., Bruyn, G.W., (eds.)
Handbook of clinical neurology.
North Holland Publishing Co. Amsterdam,
Vol. 9. p. 217. 1970
- 173 MacDonald, H.R., Phillips, R.A., Miller, R.G.,
Allograft immunity in the mouse. I. Quantitation and
specificity of cytotoxic effector cells after in
vitro sensitization.
J. Immunol. 111: 565-574, 1975
- 174 Marburg, O.,
Die sogenannte "akute multiple Sklerose".
JB Psychiatr. 27 : 211-312, 1906
- 175 Marks, N., Grynbaum, A., Benuck, M.,
On the sequential changes of MBP by cathepsins A+D.
J. Neurochem. 27: 765-768, 1976
- 176 Marks, N., Grynbaum, A., Lajtha, A.,
The breakdown of myelin-bound proteins by intra- and
extracellular proteases.
Neurochem. Res. 1: 93-111, 1976

- 177 Martenson, R.E., Kramer, A.J., Deibler, G.E.,
Large peptides of bovine and guinea pig MBP's
produced by limited peptic hydrolysis.
Biochem. 14: 1067-1073, 1975
- 178 Martenson, R.E., Levine, S., Deibler, G.E.,
Kramer, A.J.,
Comparative studies of guinea pig and bovine MBPs.
Partial characterization of chemically derived frag-
ments and their encephalitogenic activities in
Lewis rats.
J. Neurochem. 24: 173-182, 1975
- 179 Martenson, R.E., Nomura, K., Levine, S., Sowinski,
R., : EAE in the Lewis rat: Further delineation of
active sites in the guinea pig and bovine MBPs.
J. Immunol. 118: 1280-1285, 1977
- 180 Martz, E.,
Early steps in specific tumor cell lysis by sensi-
tized mouse T-lymphocytes. I. Resolution and
characterization .
J. Immunol. 115: 261-267, 1975
- 181 Martz, E.
Mechanism of specific tumor cell lysis by autoimmune
T lymphocytes.
Contemp. Top. Immunobiol. 7: 301-361, 1977
- 182 Martz, E., & Benacerraf, B.,
An effector cell independent step in target cell
lysis by sensitized mouse lymphocytes.
J. Immunol. 111: 1538-1545, 1973
- 183 Martz, E., Burakoff, B., Benacerraf, B.,
Interpretation of the sequential release of small
and large molecules from tumor cells during cyto-
lysis mediated by immune T cells or complement.
Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 71: 177-181, 1974
- 184 Matsunaga, T., & Simpson, E.,
H2 complementation in antiH-Y T cell responses can
occur in chimeric mice.
Clinical Research Center, Whatford Road, Harrow,
Middlesex HA1 3UJ England, in press.

- 185 Matter, A.,
Microcinematographic and electron microscopic
analysis of target cell lysis induced by cytotoxic
T lymphocytes.
Immunology 36: 179-190, 1979
- 186 McAlpine, D., Lumsden, C.E., Acheson, E.D.,
MS. A Reappraisal.
Churchill Livingstone, Edinburg, 1972, p. 134
- 187 McDermott, J.R., Field, E.J., Caspary, E.A.,
Relation of measles virus to encephalitogenic fac-
tor with reference to the aethiopathogenesis of MS.
J. Neurol. Neurosurg. Psychiatry 37: 282-287, 1974
- 188 McKeown, S.R., Allen, I.V.,
The cellular origin of the lysosomal enzymes in the
plaque of multiple sclerosis.
Neuropathol. Appl. Neurobiol. 4: 471-482, 1978
- 189 McPherson, T.A., Gilpin, A., Seland, T.P.,
Radioimmunoassay of CSF for encephalitogenic protein.
A diagnostic test for MS?
Can. Med. Assoc. J. 107: 856-859, 1972
- 190 Merril, J.E., Biberfeld, G., Kolmodin, G., Landin,
S., Norby, E.,
A T lymphocyte subpopulation in multiple sclerosis
patients bearing FC receptors for both IgG and IgM.
J. Immunol. 124: 2758-2764, 1980
- 191 Meyers, L.W.,
Leukocyte migration inhibition in MS.
Seiten 389-399 in Literatur 16
- 192 Miller, R.G., & Dunkley, M.,
Quantitative analysis of the 51 Chromium release
cytotoxicity assay for cytotoxic lymphocytes.
Cell. Immunol. 14: 284-302, 1974
- 193 Mills, J.A.,
The immunologic significance of antigen induced
lymphocyte transformation in vitro.
J. Immunol. 97: 239-247, 1966
- 194 Moretta, L., Mingari, M.C., Moretta, A., Cooper, M.
D., Human T lymphocyte subpopulations:

Studies of the mechanism by which T cells bearing Fc receptors for IgG suppress T-dependent B cell differentiation induced by PWM.

J. Immunol. 122: 984-990 , 1979

- 195 Moretta, L., Mingari, M.C., Romanzi, C.A.,
Loss of Fc receptors for IgG from human T lymphocytes exposed to IgG immune complexes.
Nature 272: 618-619, 1978
- 196 Moretta, L., Webb, S.R., Grossi, C.E., Lydyard, P.M., Copper, M.D.,
Functional analysis of two human T cell subpopulations: Help and suppression of B cell responses by T cells bearing receptors for IgM or IgG.
J. Exp. Med. 146: 134-200, 1977
- 197 Nomura, K., Martenson, R.E., Deibler, G.E.,
Treatment of an encephalitogenic peptide from guinea pig MBP with protease and thermolysin. Isolation of fragments and determination of cleavage sites.
J. Biol. Chem. 252: 1723-1727,
- 198 Noort, van den, S., Stjernholm, R.L.,
Lymphotoxicity activity in multiple sclerosis.
Neurol. 21: 783-793, 1971
- 199 Nordstrand, I.F., Druek, P.,
The inhibitory effect of MS and control sera on certain myelin catabolizing enzymes.
Am. Neurol. 2: 84-85, 1977
- 200 Nowak, J., & Wajgt, A.,
Surface markers on lymphocytes of MS patients.
Clin. exp. Immunol. 21:278-283,1975
- 201 Offner, H., Amnitzboll, T., Clausen, J., Fog, T., Hyllested, K., Einstein, E.,
Immune response of lymphocytes from patients with MS to phytohemagglutinin, basic protein of myelin and measles antigens.
Acta neurol. scand. 50: 373-381, 1974
- 202 Offner, H., Konat, G., Legg, N.J., Raun, N.E., Winterberg, H., Clausen, J.,
Antigenic stimulation of active E-rosette forming

- lymphocytes in MS, systemic lupus erythematoses and rheumatoid arthritis.
Clin. Immunol. Immunopathol. 16: 367-373, 1980
- 203 Oger, J.F., Arnason, B.G.W., Wrag, S.H., Kistler, P.,: A study of B and T cells in MS.
Neurology 25: 444-447, 1975
- 204 Oppenheim, J.J.,
Relationship of in vitro lymphocyte transformation to delayed hypersensitivity in guinea pigs and man.
Fed. Proc. 27: 21-28, 1968
- 205 Oppenheim, J.J., & Wolff, S. M.,
Cellular localization of carbon-14-endotoxin in cultured leukocytes.
Nature (London) 211: 767-768, 1966
- 206 Palmer, F.B., & Dawson, R.M.C.
Complex formation between triphosphoinositide and experimental allergic encephalitogenic protein.
Biochem. J. 111: 637-646, 1969
- 207 Paterson, P.Y.,
Transfer of EAE in rats by means of lymph node cells.
J. Exp. Med. 111: 119, 1960
- 208 Paterson, P.Y.,
EAE and autoimmune diseases.
Adv. Immunol. 5: 131-208, 1966
- 209 Paterson, P.Y., Day, D.E., Varitek, V.A., Peterson, D.J., Whitacre, C.C., Berenberg, R.A., Harter, D.H.,
Circulating myelin basic protein fragments: role in neuroimmunologic diseases.
Abstract No. 18.6.22 des Abstraktbandes des Kongresses für Immunologie in Paris 1980
- 210 Paterson, P.Y., & Harwin, S.M.,
Suppression of allergic encephalomyelitis in rats by means of anti-brain serum.
J. Exp. Med. 117: 755, 1963
- 211 Paterson, P.Y., & Weiss, H.S.,
Transfer of EAE in rats by intracerebral injection of lymphoid cells.
Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 119: 267, 1965

- 212 Plaut, M., Bubbers, J.E., Henney, C.S.,
Studies on the mechanism of lymphocyte induced
cytolysis. VII. Two stages in the T cell mediated
lytic cycle with distinct cation requirements.
J. Immunol. 116: 150, 1976
- 213 Poduslo, J.F., & Braun, P.E.,
Topographical arrangement of membrane proteins in
the intact myelin sheath. Lactoperoxidase incorpo-
ration of iodine into myelin surface proteins.
J. Biol. Chem. 250: 1099-1105, 1975
- 214 Prineas, J.,
Pathology of the early lesion in MS.
Hum. Pathol. 6: 531-554, 1975
- 215 Prineas, J., & Raine, C.S.,
Electron microscopy and immunoperoxidase studies in
early multiple sclerosis lesions.
Neurology 26: 29, 1976
- 216 Prineas, J., Wright, R.G.,
Macrophages, lymphocytes and plasma cells in the
perivascular compartment in chronic multiple sclerosis.
Lab. Invest. 38: 409-421, 1978
- 217 Prineas, J., & Raine, C.S.,
Electron microscopy and immunoperoxidase studies in
early multiple sclerosis lesions.
Neurology 26: 29, 1976
- 218 Raine, C.S., & Traugott, U.,
Suppression of chronic allergic encephalomyelitis:
Relevance to multiple sclerosis.
Science 201: 445-448, 1978
- 219 Raine, C.S., Snyder, D.H., Valsamis, M.P.,
Sanford, H., Stone, D.Sc.,
Chronic experimental allergic encephalomyelitis in
inbred guinea pigs. An ultrastructural study.
Lab. Invest. 31: 369-380, 1974
- 220 Rajam, P.C., & Jackson, A.L.,
Distribution and valence state of radiochromium
intracellularly labelled Ehrlich mouse ascites car-
cinoma cells. Roc. Soc. exp. Biol. Med. 99: 210-

- 211, 1959
- 221 Rauch, H.C., & Einstein, E.R.,
Induction and suppression of EAE in non-human
primate.
J. Neurol. Sci. 23: 99-116, 1974
- 222 Rauch, H.C., Ferraresi, R.W., Raffel, S., Einstein,
E.R.,: Inhibition of in vitro cell migration in EAE.
J. Immunol. 102: 1431-1436, 1969
- 223 Rauch, H.C., & Raffel, S.,
Immunofluorescent localisation of encephalitogenic
protein in myelin.
J. Immunol. 92: 452-455, 1964
- 224 Reddy, M.M., & Goh, K.O.,
B and T lymphocytes in man. III. B, T and "null"
lymphocytes in MS.
Neurology 26: 997-1005, 1976
- 225 Richards, P.T., & Cuzner, M.L.,
Proteolytic activity in CSF.
in: Palo, J., (ed.): Myelination and Demyelination.
Adv. Exp. Med. Biol., New York Plenum Press,
Vol. 100, pp. 521-527, 1978
- 226 Riekkinen, P.J., & Rinne, U.K.,
Proteases in human CSF.
J. Neurol. Sci. 7: 97-106, 1968
- 227 Rinne, U.K., & Riekkinen, P.,
Esterase, peptidase and proteinase activities of
human CSF in multiple sclerosis.
Acta Neurol. Scand. 44: 156-167, 1968
- 228 Roboz-Einstein, E., Kibler, R.F., Shapira, R.,
Species specificity in response to tryptophan
modified encephalitogen.
Immunochem. 9: 73-84, 1972
- 229 Rocklin, R.E., Sheremata, W.A., Feldman, R.G., Kies,
M.W., David, J.R.,
The Guillain -Barré syndrom and multiple sclerosis:
in vitro cellular responses to nervous-tissue anti-
gens. N. Engl. J. Med. 284: 803-804, 1971

- 230 Romine, J.S., Salk, J., Wiederholt, W.C., Westall, F.C., Jablonski, Ch. K.,
Studies on myelin basic protein administration in MS patients. II. Preliminary report of clinical observations. in: Progress in MS research. Bauer, H.J., Poser, S., Ritter, G., (eds.) Springer Verlag Berlin, Heidelberg, New York, 1980, pp. 428-453
- 231 Rosenau, W.,
Target cell destruction.
Fed. Proc. Fed. Amer. Soc. Exp. Biol. 27: 34-44, 1968
- 232 Ruddle, N.H., & Waksman, B.H.,
Cytotoxicity mediated by soluble antigen and lymphocyte in delayed hypersensitivity. III. Analysis of mechanism.
J. Exp. Med. 128: 1237-1247, 1968
- 233 Salk, J., Westall, F.C., Romine, J.S., Wiederholt, W.C., Studies on myelin basic protein administration in MS patients.
in: Bauer, H.J., Poser, S., Ritter, G., (eds.): Progress in MS research. Springer Verlag, Berlin, Heidelberg, New York, 1980, pp. 419-427
- 234 Sanderson, C.J., & Glauert, A.M.,
The mechanism of T-cell mediated cytotoxicity: VI. T-cell projections and their role in target cell killing.
Immunology 36: 119-130, 1978
- 235 Sanderson, C.J., Thomas, J.A.,
The mechanism of T-cell mediated cytotoxicity. III. Changes in target cell susceptibility during the cell cycle.
Proc. R. Soc. London. B. 194: 417-429, 1976
- 236 Santoli, D., Hall, W., Kastrukoff, L., Lisak, R.P., Perussia, B., Trinchieri, G., Koprowski, H.,
Cytotoxic activity and interferon production by lymphocytes from patients with MS.

- J. Immunol. 126: 1274-1278, 1981
- 237 Santoli, D., Moretta, L., Lisak, R., Gilden, D.,
Koprowski, H.,
Imbalances in T-cell subpopulations in MS patients.
J. Immunol. 120: 1369-1371, 1978
- 238 Schendel, D.J., Wank, R., Bonnard, G.D.,
Genetic specificity of primary and secondary pro-
liferative and cytotoxic responses of human lympho-
cytes grown in continued culture.
Scand. J. Immunol. in press 1979
- 239 Schendel, D.J., Wank, R., Dupont, B.,
Standardisation of the human in vitro cell-mediated
lympholysis technique.
Tissue antigens 13: 112-120, 1979
- 240 Seifert, J., & Messmer, K.,
Factors influencing the Cr-51 labelling of Erythro-
cytes. Eur. surg. Res. 2: 321-332, 1970
- 241 Sever, J.L., & Kurtzke, J.F.,
Delayed dermal hypersensitivity to measles and
mumps antigens among multiple sclerosis and control
patients. Neurology (Minneap.) 19: 113-115, 1969
- 242 Shaw, C.M., Alvord, E.C., Jr., Kaku, J., Kies, M.W.,
Correlation of EAE with DTH skin sensitivity to
specific homologous encephalitogen.
N. Y. Acad. Sci. 122: 318-331, 1965
- 243 Sheremata, W., Cosgrove, J.B.R., Eylar, E.H.,
Cellular hypersensitivity to basic myelin (A1) pro-
tein and clinical multiple sclerosis.
New Engl. J. Med. 291: 14-17, 1974
- 244 Siegel, I., & Sherman, W.B.,
The interaction of lymphocytes to autologous red
cells. J. Allergy Clin. Immunol. 50: 65-74, 1972
- 245 Simpson, E., Gordon, R., Taylor, M., Mertin, J.,
Chandler, P.,
Micromethods for induction and assay of mouse mixed
lymphocyte reactions and cytotoxicity.
Eur. J. Immunol. 5: 451-455, 1975

- 246 Smith, M.E.,
A lymph node neutral proteinase acting on MBP.
J. Neurochem. 27: 1077-1082, 1976
- 247 Smith, M.E.,
Studies on the mechanism of demyelination: Myelin autolysis in normal and edematous CNS tissue.
J. Neurochem. 28: 341-347, 1977
- 248 Smith, M.E.,
The role of proteolytic enzymes in demyelination in EAE. Neurochem. Res. 2: 233-246, 1977
- 249 Smith, H.V., Hughes, I.E., Hunter, G.,
Intrathecal tuberculin in disseminated sclerosis: the immunological aspects.
J. Neurol. Neurosurg. Psychiat. 24: 101, 1961
- 250 Spitler, L.E., Muller, C.M. von, Fudenberg, H.H., Eylar, E.H.,
EAE: Dissociation of cellular immunity to brain protein and disease production.
J. Exp. Med. 136: 156-174, 1972
- 251 Stone, S.H.,
Transfer of EAE by lymph node cells in inbred guinea pigs. Science (Wash. D.C.) 134: 619-620, 1961
- 252 Stone, S.H., & Lerner, E.M.,
Chronic disseminated EAE in guinea pigs.
Ann. N.Y. Acad. Sci. 122: 227-249, 1965
- 253 Stulting, R.D., & Berke, G.,
Nature of lymphocyte tumor interaction. A general method for cellular immunoabsorption.
J. Exp. Med. 137: 932-942, 1973
- 254 Suzuki, K., Andrews, J.M., Waltz, J.M., Terry, R.D.,
Ultrastructural studies of multiple sclerosis.
Lab. Invest. 20: 444-454, 1969
- 255 Swanborg, R.H.,
Immunologic response to altered encephalitogenic protein in guinea pigs.
J. Immunol. 102: 381-388, 1969
- 256 Swanborg, R.H., & Amesse, L.S.,
EAE: species variability of the encephalitogenic

- determinant.
J. Immunol. 112: 281-283, 1971
- 257 Symington, G.R., Mackay, I.R., Whittingham, S.,
White, J., Buckley, J.D.,
A profile of immune responsiveness in MS.
Clin. exp. Immunol. 31: 141-149, 1978
- 258 Ter Meulen, V.,
The role of persistent virus infection in SSPE.
in: Stephenson, J.R., & Ter Meulen, V., Seite 254
und: Evidence for JC virus genomes in organ material
from a PML patient.
in: K. Dörries, V. Reinhardt, V. Ter Meulen. S. 284
beide in: Search for the course of MS and other
chronic diseases of the central nervous system.
Boese, A., (ed.)
First international symposium of Herthie Foundation
in Frankfurt am Main. Sept 1979
Verlag Chemie 1980
- 259 Thorn, R.M., & Henney, C.S.,
Studies on the mechanism of lymphocyte mediated
cytolysis. VI. A reappraisal of the requirement
for protein synthesis during T-cell mediated lysis.
J. Immunol. 116: 146-149, 1976
- 260 Todd, R.F.,
Lymphocyte mediated cytolysis of allogeneic tumor
cells in vitro. III. Enzyme sensitivity of target
cell antigens.
Cell Immunol. 20: 257-268, 1975
- 261 Traugott, U., & Raine, R.S.,
EAE in inbred guinea pigs. Correlation of decrease
in early T-cells with clinical signs in suppressed
and unsuppressed animals.
Cell Immunol. 34: 146-155, 1977
- 262 Traugott, U., Stone, S.H., Raine, C.S.,
Chronic relapsing EAE. Correlation of circulating
lymphocyte fluctuations with disease activity in
suppressed and unsuppressed animals.
J. Neurol. Sci. 41: 17-29, 1979

- 263 Uriwan, Y., Coates, A.S., Whittingham, S., Mackay, I.R., Cellular immune response to myelin protein. Absence in MS and presence in cerebrovascular accidents.
Aust. N.Z. J. Med. 4: 535, 1974
- 264 Wagner, H., & Röllinghoff, M.,
T-cell mediated cytotoxicity. Discrimination between antigen recognition, lethal hit and cytolysis phase.
Eur. J. Immunol. 4: 745-750, 1974
- 265 Webb, S.A.,
Synthetic models in the study of EAE
Scientific council, Weizman Institut of Science
Promotionsarbeit, Weizman Institut of Science
Rehovot, Israel, 1975
- 266 Webb, C., Teitelbaum, D., Arnon, R., Sela, M.,
Correlation between strain differences in susceptibility to EAE and the immune response to encephalitogenic protein in inbred guinea pigs.
Immunol. Comm. 2: 185-192, 1973
- 267 Webb, C., Teitelbaum, D., Abramsky, O., Arnon, R., Sela, M., Lymphocytes sensitised to basic encephalitogen in patients with multiple sclerosis unresponsive to steroid therapy.
Lancet I: 66-68, 1974
- 268 Werkele
Literatur nach Engers = Lit.82
genaue Angaben nicht auffindbar
Wortlaut und Literatur kann bei mir eingesehen werden.
- 269 Westall, F.C., Robinson, A.B., Caccam, J., Jackson, J., Eylar, E.H.,
Essential chemical requirements for induction of EAE.
Nature (London) 229: 22-24, 1971
- 270 Westall, F.C., Thompson, M., Robinson, A.B.,
Degradation of MBP in aerobic ascorbic acid solutions.
Experientia 32: 848-849, 1976
- 271 Whittaker, J.N.,
MBP fragments in CSF of persons with MS.
Neurol. 27: 911-920, 1977

- 272 Whitaker, J.N., Chou, C.-H. J., Chou, F. C.-H.,
Kibler, R.F.,
Antigenic regions for the humoral response to myelin
basic protein.
Molecular Immunology 16: 495-501, 1979
- 273 Whitacre, C.C., & Paterson, P.Y.,
Transfer of EAE in Lewis rats using supernatants of
incubated sensitized lymph node cells.
J. Exp. Med. 145: 1405-1409, 1977
- 274 Whitacre, C.C., & Paterson, P.Y.,
EAE supernatant transfer activity (EAE-STA) in Lewis
rats: Immunobiologic and initial biochemical proper-
ties. J. Immunol. 124: 1784-1788, 1980
- 275 Whitehouse, D.D., Whitehouse, M.W., Pearson, C.M.,
Passive transfer of adjuvant induced arthritis and
EAE in rats using thoracic duct lymphocytes.
Nature (London) 224: 1322-1323, 1969
- 276 Whitaker, J.N.,
The antigenicity of encephalitogenic protein:
Production of antibodies to encephalitogenic protein
with desoxyribonucleic acid-encephalitogenic protein
complexes. J. Immunol. 114: 823-828, 1975
- 277 Whittingham, S., Bencina, B., Carnegie, P.R.,
McPherson, T.A.,
Properties of antibodies produced in rabbits to
human myelin basic protein.
Int. Arch. Allergy 42: 250-263, 1972
- 278 Wicher, V., Olszewski, W., Milgrom, F.,
Dual response of lymphocytes from multiple sclerosis
patients to myelin basic protein.
Clin. exp. Immunol. 37: 114-119, 1979
- 279 Wicher, V., Olszewski, W., Milgrom, F.,
Suppressed blastogenic response to MBP of lymphocytes
from multiple sclerosis patients.
Int. Arch. Allergy appl. Immunol. 59:49-57 , 1979

280 Wilson

Literatur nach Engers = Lit. 82
genaue Quellenangabe nicht auffindbar
Wortlaut und Literatur kann bei mir eingesehen werden.

281 Wolman, M.,

Distribution of various protein fractions in central
and peripheral myelin.

Exp. Neurol. 30: 309-323, 1971

282 Wood, D.D., Vail, W.J., Moscarello, M.A.,

The localisation of the basic protein and N-2 in
dised myelin.

Brain Res. 93: 463-471, 1975

283 Wybran, J., Carr, M.C., Fudenberg, H.H.,

The human rosette forming cell as a marker of a popu-
lation of thymus derived cells.

J. Clin. Invest. 41: 2537-2543, 1972

284 Zagury, D., Bernard, J., Dufer, J., et al.

The biology of isolated immunocytes. Isolation into
a closed liquid microchamber: application to PFC.

Ann. Immunol. Paris 126: 23-30, 1975

285 Zagury, D., Bernard, J., Jeannesson, P., Thiernesse,
N., Cerottini, J.-C.,

Studies on the mechanism of T cell-mediated lysis
at the single effector cell level.

I. Kinetic and analysis of lethal hit and target cell
lysis in multicellular conjugates.

J. Immunol. 123: 1604-1609, 1979

286 Zimmermann, H.M., & Netsky, M.G.,

The pathology of MS.

Res. Publ. Assoc. Nerv. Ment. 28: 271-279, 1950

287 Zinkernagel, R.M., & Doherty, P.C.,

Restriction of in vitro T cell-mediated cytotoxicity
in lymphocytic choriomeningitis with a syngeneic or
semiallogeneic system.

Nature 24: 701-702, 1974

VI Danksagung

Zu besonderem Dank bin ich verpflichtet:

Herrn Prof. Dr. Dr. h.c. W. Brendel, der mich außerordentlich freundlich in seinem Institut aufnahm.

Herrn Priv. Doz. Dr. rer. nat. B.U. von Specht, approbierter Arzt, der mir bei der Durchführung der Versuche mit Rat und Tat zur Seite stand, mich gründlich in wissenschaftliches Denken und Arbeiten einführte und dessen Kenntnisse als Chemiker, Arzt und Immunologe mir zu einem tieferen Verständnis für die Vernetzung von Struktur und Funktion des Biologischen verhalfen.

Fräulein Andrea Brehm für die immer freundliche und hilfsbereite Unterstützung bei der Durchführung des äußerst aufwendigen Untersuchungsganges, sowie bei der Anfertigung der wissenschaftlichen Abbildungen.

Frau Dr. D. J. Schendel vom Institut für Immunologie der Universität München (Vorstand Prof. Dr. G. Riethmüller) für die sehr freundliche und umfassende Einführung in spezielle Techniken der Immunologie.

Allen Ärzten und den Direktoren Prof. Dr. A. Schrader und Prof. Dr. G. Paal der Kliniken , Neurologische Klinik im Klinikum Großhadern und Neurologische Klinik im Städtischen Krankenhaus München -Harlaching, bin ich für die freundliche Hilfe bei der Durchführung der Studie und der klinischen Evaluation des Patientenguts zu großem Dank verpflichtet.

Besonderer Dank gilt Frau Dr. Boess und Herrn OA. Dr. Neu.

Bedanken möchte ich mich weiterhin bei allen Patienten, die sich der Forschung zur Verfügung stellten, sowie allen anderen Personen, die in irgendeiner Weise mir bei diesem Projekt hilfreich zur Seite standen.

VII. LEBENSLAUF

Am 15. Mai 1957 wurde ich als ältester Sohn des Polizeibeamten Karl Zitzelsberger und seiner Ehefrau Mathilde Zitzelsberger, geb. Hager, in München Schwabing geboren.

Von 1963-1967 besuchte ich die Volksschule am Amphionpark in München Moosach. Daran schloß sich der Besuch des neusprachlichen Zweiges des Rupprecht Gymnasiums München an. Meine Reifeprüfung legte ich dort vom 17.-20. Mai 1976 ab.

Am 22.6.1976 erfolgte die Aufnahme in die Förderung Hochbegabter nach Art. 10, Absatz 1 BayBFG.

Nach einem zweimonatigen Krankenpflegepraktikum am Krankenhaus Neuwittelsbach (München) begann am 1.10.1976 mein Medizinstudium an der Ludwig-Maximilians-Universität München.

Während des Studiums machte ich mich durch vielfältige Famulaturen mit dem Wunderwerk der Medizin vertraut. So durchlief ich die Sparten Anästhesie im Jan. - Feb. 1979 an der Universitäts Poliklinik in der Pettenkoferstraße München (Leiter: Prof. Doenicke), öffentliches Gesundheitswesen im März 1979 am Städtischen Gesundheitsamt München (Leiter: Prof. Kathke), Urologie im April 1979 am Kreiskrankenhaus Deggendorf (Leiter der Urologie: Prof. Carl), Transplantationsmedizin im Oktober 1979 im Klinikum Großhadern München (Prof. Land), Chirurgie im April 1980 am Kreiskrankenhaus Dingolfing (Chefarzt Dr. Schröder), Innere Medizin im August 1980 am Rotkreuzkrankenhaus München (Chefarzt Dr. Korinth) und Tropenmedizin mit Gynäkologie und Pädiatrie im März-April 1981 am Bulongwa Lutheran Hospital in Tanzania (Leiterin Dr. Schmid).

Vom 21.7.1980-30.9.1980 war ich mit Teilzeitarbeitsvertrag auf der chirurgischen Intensivstation des Klinikums Großhadern beschäftigt.

Das praktische Jahr absolvierte ich in Innerer Medizin am Städtischen Krankenhaus Neuperlach (Prof. Ottenjann),

in Chirurgie an der Chirurgischen Klinik Nußbaumstraße (Prof. Schweiberer) und in Radiologie an der Radiologischen Klinik im Klinikum Großhadern (Prof. Lissner).

Die vorgeschriebenen Prüfungen der Approbationsordnung wurden alle termingerecht bestanden.

Mein Studium schloß ich am 26.10.1982 mit der Ärztlichen Prüfung ab. Die Approbation als Arzt wurde mir am 29.10. 1982 erteilt.

Die hier vorliegende Doktorarbeit wurde vom Okt. 1979 bis Dez. 1982 am Institut für Chirurgische Forschung der Universität München (Direktor Prof. Dr. Dr. h.c. W. Brendel) erstellt.

Am 2.7.1982 erfolgte meine Heirat mit Rosa-Maria Zitzelsberger, geb. Ebner.

Ab 1.1. 1983 werde ich an der Chirurgischen Klinik der Universität München, Klinikum Großhadern, (Direktor Prof. Dr. G. Heberer) tätig sein.

